

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
des Veterinärwissenschaftlichen Departments
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle
Arbeit erstellt unter der Leitung von PD Dr. Barbara Schalch

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dienststelle: Oberschleißheim
Dr. Ulrich Busch

**Molekularbiologische Typisierung der
Shigatoxingene von *Escherichia coli* aus
Wasser, Fäzes und Lebensmitteln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
A n j a Rosemarie Bischoff
aus Gunzenhausen

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Referentin:	Priv.-Doz. Dr. Schalch
Koreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

Meiner Oma

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	2
2.1	Bakterium <i>Escherichia coli</i>	2
2.2	Pathogene <i>E. coli</i>	3
2.3	Shigatoxinbildende <i>E. coli</i>	4
2.4	Epidemiologie der STEC	13
2.4.1	Tiere als Reservoir	13
2.4.2	Oberflächengewässer	16
2.4.3	Lebensmittel	16
2.4.4	Trinkwasser	20
2.4.5	Mensch-zu-Mensch-Übertragungen	20
2.5	Klinisches Bild einer EHEC-Infektion	21
2.6	Labordiagnostischer Nachweis	22
2.7	Rechtlicher Hintergrund	23
2.8	Molekularbiologische Nachweismethoden	25
2.8.1	Polymerasekettenreaktion	25
2.8.2	Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler®	26
2.8.3	Sequenzierung nach Sanger (Didesoxynukleotidmethode)	28
3.	Material und Methoden	29
3.1	Ziele und Vorgehensweise	29
3.2	Untersuchungsmaterialien	30
3.3	PCR-Untersuchung und Schmelzkurvenanalyse	30
3.3.1	Vorbereitung	30
3.3.2	Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler®	31
3.3.3	Konventionelle PCR	35
3.4	Sequenzanalyse	38
3.4.1	PCR-Reaktion und Aufreinigung des PCR-Produkts	38
3.4.2	Sequenzierreaktion	39
3.5	Auswertung der Sequenziererergebnisse	40
4.	Ergebnisse	43
4.1	Überblick	43
4.2	Ergebnisse der Real-Time-PCR	44
4.3	Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse	46

4.3.1	Schmelztemperaturen der Shigatoxintypen	47
4.3.2	Nachweis der Shigatoxintypen einzeln und in Kombination	47
4.3.3	Verteilung der Shigatoxintypen in verschiedenen Matrices	51
4.3.4	Abweichende Isolate	53
4.4	Ergebnisse der Sequenzierung	54
4.5	Ergebnisse der konventionellen PCR und weiterführender Untersuchungen	57
5.	Diskussion	60
5.1	Methoden und Ergebnisse	60
5.1.1	Methodenbetrachtung Real-Time-PCR	60
5.1.2	Methodenbetrachtung Schmelzkurvenanalyse	60
5.1.3	Verlust des Shigatoxingens	62
5.1.4	Detektion von Toxinvarianten	62
5.1.5	Ergebnisbetrachtung bezogen auf Shigatoxintyp und Matrices	63
5.1.6	Ergebnisbetrachtung hinsichtlich der Virulenz	65
5.2	Schlussfolgerung	67
6.	Zusammenfassung	69
7.	Summary	70
8.	Anhang	71
8.1	Anhang zu "Material und Methoden"	71
8.1.1	Zubehör und Verbrauchsmaterialien	71
8.1.2	Chemikalien	72
8.1.3	Geräte	73
8.2	Anhang zu "Ergebnisse"	74
9.	Abkürzungsverzeichnis	96
10.	Abbildungsverzeichnis	98
11.	Tabellenverzeichnis	100
12.	Literaturverzeichnis	102

1. Einleitung

Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind seit dem ersten großen lebensmittelbedingten Ausbruch in den USA im Jahr 1982 weltweit ein aktuelles Thema. Im September 2006 machte ein Ausbruch mit mehr als 200 erkrankten Personen aus 26 amerikanischen Staaten Schlagzeilen, bei welchem Spinat als Infektionsquelle angenommen wurde. In der Europäischen Union wurden für das Jahr 2006 aus 22 Mitgliedsstaaten 4916 Fälle von EHEC-Infektionen beim Menschen gemeldet. Die Inzidenz für Bayern betrug 1,8 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Bayern hat mit der Einführung einer Meldepflicht für EHEC-Ausscheider im Jahr 1996 und der Schaffung eines umfassenden Sentinel-Systems eine entscheidende Vorreiterrolle in Deutschland eingenommen und mit dazu beigetragen, die EHEC-Problematik in den Blickpunkt des öffentlichen Gesundheitswesens zu rücken.

Als Reservoir für Shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC) dienen vor allem Wiederkäuer, die Infektion erfolgt über fäkal kontaminierte Lebensmittel, direkten Kontakt zu Wiederkäuern sowie auch als Schmierinfektion von Mensch zu Mensch. Besonders gefährdete Personengruppen sind Kleinkinder, ältere, schwangere und immunsupprimierte Menschen. Die Symptome einer Erkrankung reichen von Bauchschmerzen, Durchfall und Erbrechen bis zu Fieber. Bei etwa 5 % der Erkrankten kommt es zu einer postinfektiösen Komplikation, dem enteropathischen Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS), welches unter Umständen tödlich verlaufen kann.

Nach derzeitigem wissenschaftlichen Kenntnisstand scheint ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer Erkrankung und den jeweiligen Shigatoxintypen zu bestehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit der Methode der Schmelzkurvenanalytik von PCR-Produkten einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Shigatoxintypen in Isolaten aus Oberflächenwasser, Trinkwasser, Lebensmitteln und Fäzes zu erlangen, um nähere Erkenntnisse über das spezifische Gefährdungspotenzial zu gewinnen. Als Basis für die Erhebung wurden EHEC/STEC-Isolate des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gewählt.

2. Literatur

2.1 Bakterium *Escherichia coli*

Das Stäbchenbakterium *Escherichia (E.) coli* wurde im Jahre 1885 von dem Pädiater Theodor



Escherich (siehe Bild 1, geboren 1857 in Ansbach, gestorben 1911 in Wien) im Stuhl von Säuglingen entdeckt. Die ursprüngliche Bezeichnung "*Bacterium coli commune*" wurde 1919 in *Escherichia coli* geändert. Escherich, ein Wegbereiter der Bakteriologie, sah bereits damals in seinem Werk "Monographie über die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung" einen Zusammenhang zwischen Durchfallerkrankungen und bestimmten *E.-coli*-Stämmen (Hadorn, 1997).

E. coli sind gerade Stäbchen mit einer Länge von 2,0 bis 6,0 µm und einer Breite von 1,1 bis 1,5 µm, unbeweglich oder durch peritriche Begeißelung beweglich, Gram-negativ und fakultativ anaerob. Sie bilden häufig eine Kapsel und gehören mit einem Wachstumsoptimum von 37 °C zu den mesophilen

Bild 1: Theodor Escherich

Bakterien; die Generationszeit beträgt etwa 20 min (Scheutz und Strockbine, 2005). *E. coli* sind bei Säugern meist Bestandteil der Normalflora des Dickdarms und gehören hier mit 10^4 bis 10^9 KBE/g Fäzes zur Begleitflora. Als Erstbesiedler dienen *E. coli* auch als Wegbereiter für die Ansiedelung obligater Anaerobier. Sie üben eine wichtige Funktion in der gesunden Verdauung aus (N. N., 2000a; Sonnenborn und Greinwald, 1991).

Aufgrund ihres natürlichen Habitats im Darm haben *E. coli* zusätzlich eine Indikatorfunktion für fäkale Kontaminationen im Lebensmittelbereich (Huang et al., 1997).

2.2 Pathogene *E. coli*

Neben den für die Darmflora wichtigen intestinalen, kommensalisch lebenden, apathogenen *E. coli* haben sich im Laufe der Evolution auch pathogene *E. coli* entwickelt, welche ein weites Spektrum unterschiedlicher intestinaler sowie extraintestinaler Erkrankungen bei Mensch und Tier hervorrufen können (Law, 2000; Pupo et al., 1997).

Zu den enterovirulenten *E.-coli*-Pathovaren gehören (Bülte und Goll, 2006; Nataro und Kaper, 1998):

- Enterohämorrhagische *E. coli*
- Enteropathogene *E. coli*
- Enterotoxische *E. coli*
- Enteroinvasive *E. coli*
- Enteroaggregative *E. coli*
- Diffus-adhärenzte *E. coli*

Diese oben aufgeführten sind als darmpathogene *E. coli* nach § 7 Infektionsschutzgesetz (2001) meldepflichtig. EHEC kommen unter diesen darmpathogenen *E. coli* dabei als Erreger mit zoonotischem Potenzial eine besondere Bedeutung zu (Conraths et al., 2004).

Zu den extraintestinal pathogenen *E. coli* zählen (Levine, 1987; Tschäpe und Fruth, 2000):

- Uropathogene *E. coli*
- Nephropathogene *E. coli*
- Septisch-meningitale pathogene *E. coli*

Die Charakterisierung von *E.-coli*-Isolaten erfolgt aufgrund antigener Oberflächenstrukturen durch die Einteilung in Serotyp und Serovar. Der epidemiologisch bedeutsamste Serotyp ist O157, es wurden jedoch zusätzlich eine Vielzahl anderer Serotypen identifiziert (N.N., 2006a), darunter werden mehr als 60 in Verbindung mit menschlichen Erkrankungen gebracht (Acheson und Keusch, 1999; Paton und Paton, 1998). Zu den am häufigsten isolierten Serotypen gehören dabei O157, O146, O145, O128, O111, O103, O91 und O26 (Hartung, 2008, N.N., 2008a).

2.3 Shigatoxinbildende *E. coli*

Konowalchuk et al. berichteten 1977 über ein bis dahin unbekanntes Zytotoxin aus *E.-coli*-Stämmen, welches einen toxischen Effekt auf Verozellen, jedoch nicht auf Y-1-Zellen oder CHO-Zellen ausübte. Dieses Toxin unterschied sich damit deutlich von den bis dahin bekannten hitzestabilen bzw. hitzelabilen Enterotoxinen der Enterotoxischen *E. coli*. Die Benennung erfolgte aufgrund dessen als Verotoxin (VT), die dazugehörigen *E.-coli*-Stämme wurden als Verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet.

Etwa zeitgleich konnten O'Brien et al. (1977) ein dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 ähnliches Toxin in *E.-coli*-Stämmen nachweisen. Die Autoren wählten die Bezeichnung Shiga-like-Toxin (SLT). Unter den untersuchten Stämmen befand sich auch ein von Konowalchuk et al. (1977) charakterisierter Stamm (O'Brien et al., 1977; 1982; 1983a). O'Brien und La Veck (1983b) führten den Nachweis, dass es sich bei SLT und VT um das gleiche Toxin handelt.

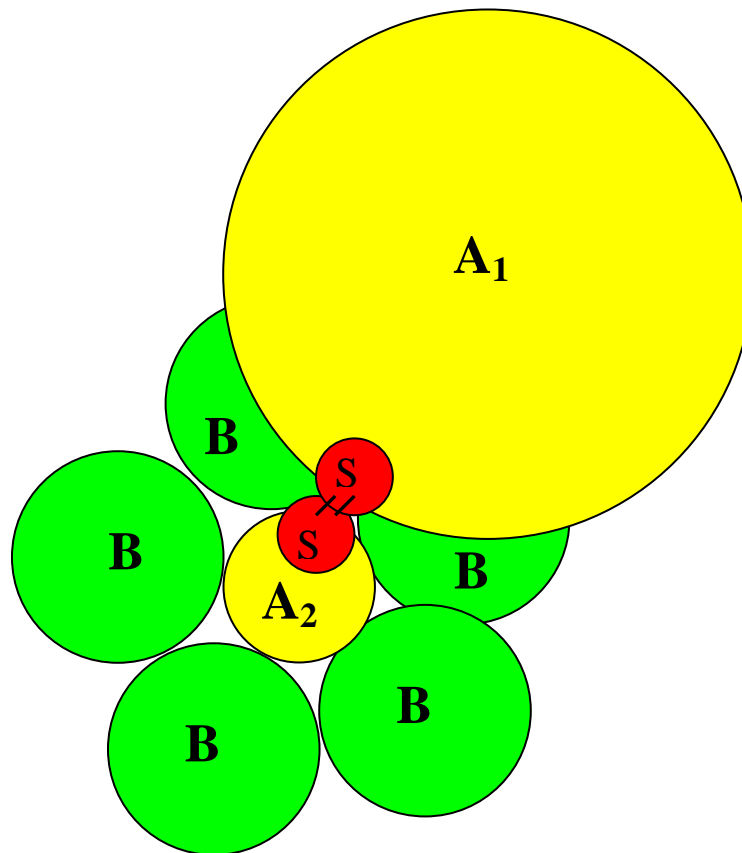
Die Termini VT (Verotoxin) und Stx (Shigatoxin) bzw. VTEC (Verotoxinbildende *E. coli*) sowie STEC (Shigatoxinbildende *E. coli*) werden synonym verwendet. Die Kursivschreibweise mit kleinem Anfangsbuchstaben (*stx*) bezeichnet das kodierende Gen, das Genprodukt wird dagegen groß und nicht kursiv geschrieben (Stx). Nach Bockemühl und Karch (1996) werden alle diejenigen *E. coli* als EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*) bezeichnet, die beim Menschen unter Bildung von Zytotoxinen zur Auslösung von klinischen Erkrankungen befähigt sind. Das Robert Koch-Institut verwendet die Begriffe STEC/EHEC und VTEC bedeutungsgleich (N.N., 2004).

Ein Zusammenhang zwischen der humanen Erkrankung "Hämolytisch-Urämisches Syndrom" (HUS) und einer Infektion mit STEC wurde bereits 1983 von Karmali et al. geschlussfolgert. Die Identifizierung der EHEC als Pathovar erfolgte aufgrund zweier Ausbrüche hämorrhagischer Colitis in den USA. Riley et al. (1983) isolierten dabei einen vorher relativ seltenen Serotyp *E. coli* O157:H7. Dieses Bakterium ließ sich sowohl im konsumierten Rinderhack als auch in Stuhlproben der nach dem Verzehr des Hackfleisches erkrankten Personen nachweisen.

Klinisch-veterinärmedizinische Bedeutung kommt den STEC vor allem als Enteritiserreger bei Kälbern in den ersten Lebenswochen zu. Hier lassen sich, ähnlich dem menschlichen Erkrankungsbild, eine Atrophie der Mikrovilli, die Schädigung von Epithelzellen und eine diffuse Infiltration neutrophiler Granulozyten in Lamina propria und Darmlumen nachweisen (Naylor et al., 2005). Eine wässrige, zuweilen auch blutige Diarrhö tritt ebenfalls beim Kaninchen auf (Garcia et al., 2002). Sancak et al. (2004) lieferten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit STEC und Durchfallerkrankungen beim Hund. Eine wichtige Rolle in der Veterinärmedizin spielt auch die Ödemkrankheit der Absatzferkel mit teils letalem Ausgang und wirtschaftlichen Folgen für die Schweineproduktion (Barman et al., 2008).

Wichtigster Virulenzfaktor und namensgebendes Charakteristikum aller STEC ist die Fähigkeit, Shigatoxin zu produzieren. Stx gehört neben Botulinumtoxin zu den potentesten bakteriellen Giften (Karmali, 1989). Der Name Shiga leitet sich von dem Japaner Kiyoshi Shiga ab, welcher 1898 nach einer epidemischen bakteriellen Dysenterie in Japan eine genaue Beschreibung von *Shigella dysenteriae* Serotyp 1 lieferte.

Der grundsätzliche Aufbau des Shigatoxins wird in Grafik 2 dargestellt. Es handelt sich um Holotoxine, welche aus einer enzymatisch aktiven A- und fünf identischen, ringförmig angeordneten B-Untereinheiten (jeweils 7,7 kDa) bestehen. Die A-Untereinheit besteht aus A₁ mit einer Größe von 28 kDa und A₂ mit 4 kDa. A₁ und A₂ sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Die A₁-Untereinheit stellt das enzymatisch aktive Zentrum dar, wohingegen die A₂-Untereinheit für die Bindung an die B-Untereinheiten zuständig ist (Lacy und Stevens, 1998; Lingwood et al., 1987).

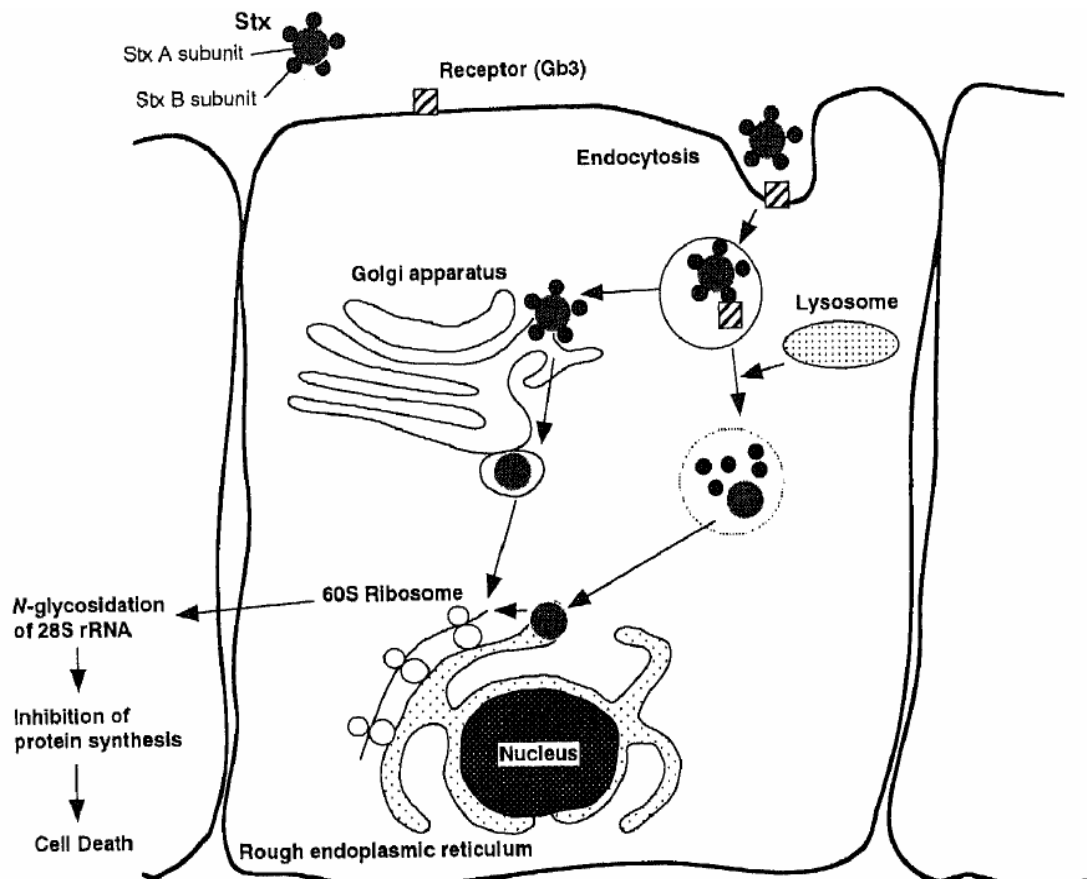


Grafik 2: Shigatoxin schematisch, modifiziert nach Borell (2005)

Als Hauptrezeptor im Organismus dient Globotriosylceramid (Gb_3), ein Glykolipid-Rezeptor, welcher sich auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen befindet, daneben wurde auch Globotetraosylceramid (Gb_4) als Rezeptor nachgewiesen (Lingwood, 1996; Nataro und Kaper, 1998). Zu den Gb_3 -reichen Geweben zählen intestinale, renale und kapillare Endothelzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen sowie ZNS-Gewebe (Proulx et al., 2001). Wie in Grafik 3 dargestellt, wird das Toxin nach der Bindung an den Rezeptor per Endozytose aufgenommen und retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Nucleus transportiert (Arab und Lingwood, 1998; Sandvig und van Deurs, 2000).

Die A-Untereinheit wird in das Zytoplasma verlagert. Während dieser Phase entstehen durch Spaltung einer Schwefelbindung ein katalytisch aktives A_1 - und ein A_2 -Fragment. Die A_1 -Untereinheit spaltet die N-glykosidische Bindung in der 28S rRNA der 60S ribosomalen

Untereinheit, was zu einer Hemmung der Bindung der Aminoacyl-tRNA an die 60S-Untereinheit des Ribosoms führt und somit die Verlängerung der Peptidkette verhindert. Die irreversible Hemmung der Proteinbiosynthese führt letztlich zum Tod der Zelle (Friedrich, 2002a; Karmali, 1989).

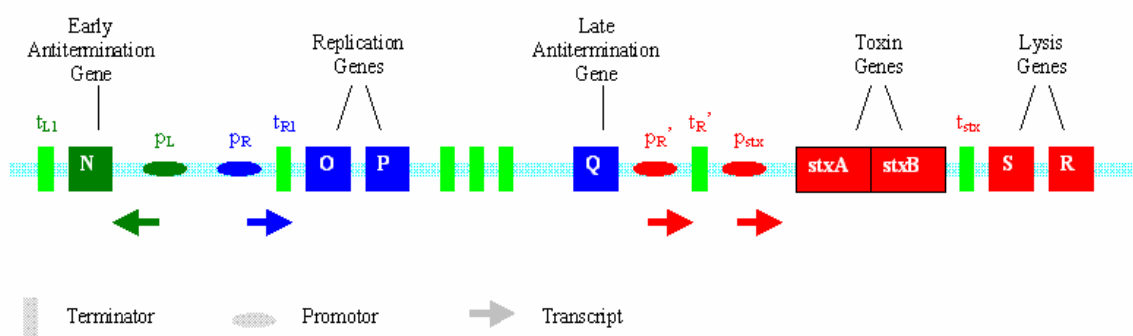


Grafik 3: Modell der Toxinaufnahme und des Toxintransports, modifiziert nach Nakao und Takeda (2000)

Die Shigatoxingene sind auf temperenten, lambdoiden Phagen lokalisiert (Scotland et al., 1985). Phagen sind Viren, welche sich in Bakterien vermehren. Lambdoide Phagen zeigen typischerweise eine Kopf-Schwanz-Struktur und sind verwandt mit dem Phagen λ . Als temperent werden Phagen bezeichnet, die sich auf zwei Arten in einem Bakterium vermehren können. Hierbei unterscheidet man zwischen dem lytischen, mit dem Tod der Wirtszelle endenden Vermehrungszyklus und dem lysogenen Zyklus, in welchem virale Genome ohne die Zerstörung des Wirtes entstehen. Der lysogene Zyklus ist ein Merkmal der Stx-Phagen

und wurde am Beispiel des Phagen Lambda beschrieben: Der Phage bindet an die Zelloberfläche und injiziert die DNA in das Bakterium. Im Wirt baut sich das Phagengenom an einer spezifischen Stelle in das Bakterienchromosom ein und wird dann als Prophage bezeichnet. Bei jeder darauffolgenden Zellteilung wird die Phagen-DNA zusammen mit der DNA des Bakteriums repliziert und so an die Tochterzellen weitergegeben. Innerhalb kurzer Zeit entsteht eine große Bakterienpopulation, welche zusätzlich die genetische Information des Phagen enthält. Der lytische Zyklus wird während des lysogenen Zyklus durch ein Repressorprotein verhindert. Durch eine Inaktivierung des Repressorproteins, welche in vitro durch Umwelteinflüsse (Strahlung, Antibiotika) ausgelöst werden kann, verlässt das virale Genom das bakterielle Chromosom und es folgt die Transkription und Translation der viralen Gene. Die Freisetzung der vom Wirt produzierten Phagenpartikel erfolgt durch die enzymatische Auflösung der Zellwand durch Lysozym, dabei nimmt die geschädigte Zellwand osmotisch Wasser auf und platzt. Nun können die in der Bakterienzelle hergestellten Phagenpartikel umliegende Zellen infizieren (Campbell, 1994; 1997, Plunkett et al., 1999).

Grafik 4 zeigt die Karte eines *stx*-kodierenden Prophagen. Die Strukturgene werden jeweils A und B genannt (*stxA*, *stxB*). Sie sind immer in der gleichen Region des Phagengenoms lokalisiert und liegen tandemartig hintereinander. Zwischen den Strukturgenen liegt eine nichtkodierende Sequenz von 12 bis 15 bp (Jackson et al., 1987; Karch et al., 1999).



Grafik 4: Karte eines integrierten Bakteriophagen (modifiziert nach Wagner und Waldor, 2002)

Die *stx*-Gene sind dabei etwa 8 kb vom Replikationsursprung (Gene *o* und *p*) des Bakteriophagen entfernt. Flankiert werden sie von einer als "N-independent-growth"-bezeichneten Region und dem Antiterminator Q (strangabwärts) sowie der Lysekassette des Phagen, bestehend aus den Genen S und R (strangaufwärts) (Datz et al., 1996; Karch et al., 1999; Neely und Friedmann, 1998).

Innerhalb der Shigatoxine der *E. coli* werden zwei serologisch unterschiedliche Toxingruppen unterschieden, die nach Strockbine et al. (1988) als 1 und 2 bezeichnet werden. Auf Nukleotidebene ist *stx1* nahezu identisch mit dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1, wohingegen zu *stx2* lediglich eine Nukleotidsequenzhomologie von 56 % vorliegt (Jackson et al., 1987).

Die Differenzierung innerhalb einer Gruppe erfolgt nach O'Brien et al. (1994) aufgrund von Unterschieden in der serologischen Reaktivität, der Rezeptorbindung oder der biologischen Aktivität in einzelne Toxintypen, welche auch als Subtypen bzw. Varianten bezeichnet werden (siehe Tabelle 1).

Paton et al. (1995) konnten aus einem Isolat vom Schaf einen neuen Shigatoxintyp isolieren, der durch weitere Untersuchungen von Zhang et al. (2002) auch in humanen Proben nachgewiesen wurde und als *stx1c* bezeichnet wird. Zu dem Prototyp *stx1* (Phage 933J) konnte eine Aminosäuresequenzidentität von 97,1 bzw. 96,6 % zur A- bzw. B-Untereinheit festgestellt werden.

Bürk et al. (2003) entdeckten einen weiteren Shigatoxintyp *stx1d*, isoliert aus bovinen Fäzes, welcher eine Nukleotidsequenzhomologie zum Toxintyp *stx1* aus dem Phagen 933J von 91 % aufweist. Auf Aminosäureebene konnte ein Austausch von 27 Aminosäuren nachgewiesen werden, wovon 20 Aminosäuren in der A-Untereinheit des Toxins ausgetauscht wurden und sieben in der B-Untereinheit. Zum Shigatoxintyp *stx1c* wies man eine Nukleotidsequenzhomologie von 92 % nach. Beim Vergleich der Shigatoxintypen *stx1*, *stx1c* und *stx1d* wurden 123 unterschiedliche Nukleotide detektiert. Davon konnte in 28 Positionen eine Nukleotidsequenzübereinstimmung zwischen *stx1c* und *stx1d* festgestellt werden und zwölf-mal zwischen *stx1* und *stx1d*. Ein Sequenzunterschied zu den beiden Shigatoxintypen *stx1* und *stx1c* wurde 83mal zu Shigatoxintyp *stx1d* detektiert.

Die Shigatoxingruppe 2 besteht ebenfalls aus mehreren Toxintypen. Den Toxintyp *stx2c* fanden Schmitt et al. (1991) in einem humanen *E.-coli*-0157-Isolat, welches sowohl *stx2* als auch den neuen Shigatoxintyp *stx2c* enthielt. Im Vergleich zu *stx2* wurden vier unterschiedliche Basen im Gen für die A-Untereinheit, jedoch ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz und elf unterschiedliche Basen in der B-Untereinheit, welche drei Aminosäurenunterschiede bewirkten, entdeckt.

Eine Nukleotidsequenzhomologie von 94,9 % zur A-Untereinheit von *stx2* und 86,6 % zur B-Untereinheit konnten Pierard et al. (1998) für den Shigatoxintyp *stx2d* EH250 (nachfolgend als *stx2d* bezeichnet) nachweisen. Melton-Celsa et al. (1996) ermittelten einen vom Shigatoxintyp Stx2d differenzierten Shigatoxintyp Stx2d_{activatable}, welcher sich durch eine 10 bis 1000fach gesteigerte Zytotoxizität gegenüber Verozellen vom Toxintyp Stx2d unterscheidet und auch in Rindern und Schafen nachgewiesen werden konnte (Kokai-Kun et al., 2000; Nitzsche et al., 2007; Tasara et al., 2008).

Weinstein et al. (1988) isolierten den später als *stx2e* benannten Shigatoxintyp aus Schweinen mit Ödemkrankheit. Im Gegensatz zu Stx2 wirkt Stx2e lediglich auf Vero-, jedoch nicht auf HeLa-Zellen toxisch. Auf Nukleinsäurebasis zeigt sich eine Homologie von 94 % zur A-Untereinheit von *stx2* und von 79 % zur B-Untereinheit.

Aus Taubenfäzes isolierten Schmidt et al. (2000) den Shigatoxintyp Stx2f mit einer Prävalenz von 12,5 %. Eine Übereinstimmung zur Nukleotidsequenz von *stx2* findet sich in der A-Untereinheit zu 63,4 % und in der B-Untereinheit zu 75,4 %. Aufgrund einer hohen Homologie zu einem von Gannon et al. (1990) isolierten Toxintyp VT2va aus einem Patientenisolat aus Kanada schlugen Schmidt et al. (2000) eine Umbenennung ebenfalls in Stx2f vor. Dies war der einzige Fall, bei dem Stx2f bisher in Verbindung mit einem Nachweis beim Menschen gebracht werden konnte.

Den zytotoxisch auf Vero- und HeLa-Zellen wirkenden Shigatoxintyp Stx2g konnten Leung et al. (2003) aus Rinderfäzes mit einer Prävalenz von 0,7 % isolieren. Untersuchungen auf *stx2g* in porzinen oder humanen VTEC-Stämmen verliefen negativ, bisher wurde dieser Shigatoxintyp nicht in Verbindung mit humanen Erkrankungen gebracht.

Toxintyp	Referenzstamm	Quelle
Stx1	H19 C600 (933J)	Scotland et al., 1985; Strockbine et al., 1988
Stx1c	3115/97 + 4756/98 + 295/00	Zhang et al., 2002
Stx1d	MHI 813	Bürk et al., 2003
Stx2	C600 (933W)	Strockbine et al., 1988
Stx2c	E32511	Schmitt et al., 1991
Stx2d	EH250	Pierard et al., 1998
Stx2d _{activatable}	B2F1	Melton-Celsa et al., 1996
Stx2e	S1191	Weinstein et al., 1988
Stx2f	T4/97	Schmidt et al., 2000
Stx2g	7v	Leung et al., 2003
Variante	ECB-217	De Baets et al., 2004
Variante	3615-99	Reischl et al., 2002

Tabelle 1: *E.-coli*-Shigatoxintypen mit Referenzstämmen

Verschiedene Studien zeigten, dass sich den unterschiedlichen Shigatoxintypen auch eine unterschiedlich ausgeprägte Virulenz zuordnen lässt (Bielaszewska et al., 2006; Boerlin et al., 1999, Friedrich et al., 2002b, 2003; Mellmann et al., 2004; Nataro und Kaper, 1998; Persson et al., 2007; Zhang et al., 2005). So konnten Mellmann et al. (2004) in einer Untersuchung von 622 humanen STEC-Isolaten bei 58,7 Prozent der HUS-Erkrankten *stx2* detektieren, bei weiteren 23,9 Prozent die Kombination *stx2/2c*. Die restlichen 17,4 Prozent verteilten sich auf *stx1* (3,9 Prozent), *stx2c* (3,6 Prozent) *stx1* + *stx2* (8,5 Prozent), *stx1* + *stx2c* (6 Prozent) sowie mit 0,3 Prozent auf die Kombination *stx1* + *stx2/2c*. Der Shigatoxintyp *stx2d_{activatable}* wurde von Bielaszewska et al. (2006) als signifikant mit einem schwerwiegenden Verlauf der Erkrankung bis zur Entwicklung von HUS assoziiert. Kein Zusammenhang mit HUS und Diarrhö konnte sowohl für die Shigatoxintypen *stx1d*, *stx2d*, *stx2e* und *stx2f* als auch für die Kombinationen *stx1* + *stx2d* sowie *stx1c* + *stx2d* nachgewiesen werden. Friedrich et al. (2002b) fanden in einer Untersuchung von asymptomatischen Ausscheidern bei 46,8 Prozent *stx1*. Die Kombination *stx1* + *stx2d* konnte in 11,5 Prozent der Fälle, *stx2d* bei 10,4 Prozent der asymptomatischen Ausscheider nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass als initiale Risikofaktoren für die Entwicklung eines HUS die Infektion mit *stx2*, *stx2c*, *stx2d_{activatable}* oder *stx1* angesehen werden muss, während *stx1d*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* und

stx2g zu Diarrhö oder asymptomatischem Ausscheidertum führen bzw. bisher nicht bei Menschen nachgewiesen wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Boerlin et al. (1999) und Zhang et al. (2005).

Als wichtigsten Faktor in der Entwicklung eines HUS sahen auch Ethelberg et al. (2004) neben dem Alter eine Infektion mit Shigatoxintyp Stx2. Die mögliche Ursache hierfür könnte in der von Louise und Obrig (1995) beschriebenen 1000fach erhöhten zytotoxischen Potenz gegenüber humanen mikrovaskulären Nierenendothelzellen von Stx2 im Vergleich zu Stx1 liegen. Erstaunlich ist, dass die Nierenendothelzellen dabei eine 10fach höhere Bindungskapazität für Stx1 aufwiesen als für Stx2. Neben dieser ex vivo Zytotoxizitätsstudie wurden die Beobachtungen der differenzierten Virulenz auch durch Maus-Modell-Versuche bestätigt (Tesh et al., 1993). Weitere experimentelle Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Stx2 und dem Auftreten eines Hämolytisch-Urämischen Syndroms wurden von Siegler et al. (2003) in einem Primatenmodell durchgeführt. Die intravenöse Injektion von Stx2 führte zum klinischen Bild von HUS, wohingegen die Injektion von Stx1 keine klinischen, labordiagnostischen oder histologischen Anzeichen von HUS zur Folge hatte.

Die Verbreitung der einzelnen Shigatoxintypen differiert stark. Stx1c wurde häufiger vom Schaf isoliert als vom Rind, wohingegen in bovinen Isolaten überwiegend Stx1 nachgewiesen wurde (Brett et al., 2003). Zu Stx1d liegen nur wenige Daten vor, von Mayrshofer (2005) wurde *stx1d* in gleicher Prävalenz wie *stx1c* beim Rind nachgewiesen und auch aus humanen Proben isoliert (Kuczius et al., 2004). Über eine Isolierung dieses Shigatoxintyps aus Meeresfrüchten berichteten Gourmelon et al. (2006).

Stx2 wurde neben den humanen Isolaten auch in Lebensmitteln und beim Rind gefunden und häufig zusammen mit Stx2c isoliert (Bülte, 2001; Lang et al., 2005a; Schmitt et al., 1991). Ramachandran et al. (2001) konnten zeigen, dass Stx2d innerhalb der Shigatoxingruppe 2 beim Schaf eine führende Rolle übernimmt. Bei Untersuchungen an Wildwiederkäuern konnten Lehmann et al. (2006) den Shigatoxintyp Stx2d bei 85,3 % der STEC-positiven Isolate detektieren. Von Bülte (2001) untersuchte Lebensmittel enthielten zu 4,1 % Stx2e. Stx2f wurde bis auf einen menschlichen Erkrankungsfall bisher nur aus Taubenfäzes isoliert (Friedrich et al., 2002b; Schmidt et al., 2000). Der Shigatoxintyp Stx2g konnte in einer

Untersuchung an vietnamesischen Wiederkäuern in 2,9 % der Isolate aus der Shigatoxin-2-Gruppe isoliert werden (Vu-Khac und Cornick, 2008)

2.4 Epidemiologie der STEC

2.4.1 Tiere als Reservoir

Eine weite Verbreitung in der Umwelt erreichten Shigatoxinbildende *E. coli* aufgrund ihrer Fähigkeit den Darm von Wiederkäuern zu kolonisieren und etablierten sich damit als Zoonoseerreger (Bülte, 1997; Wang et al., 1996). Große und kleine Wiederkäuer gelten gemeinhin als Reservoir für STEC, ohne selbst daran zu erkranken (Bülte, 2002; Caprioli et al., 2005; Naylor et al., 2005; Roldgaard et al., 2004). In einer von Mayrshofer et al. (2004) durchgeführten Studie an deutschen Schlachtrindern waren 47,5 % der untersuchten Kotproben STEC-positiv, ähnliche Werte wurden auch von Messelhäuser (2005) in einer Verlaufsuntersuchung an Almkühen erzielt. Interessant ist, dass in einer Gesamtbetrachtung des Untersuchungszeitraums von mehreren Monaten 71 % aller Tiere mindestens einmal positiv getestet wurden (Messelhäuser, 2005). Betrachtet man die Nachweisrate auf Bestandesebene, so wiesen Blanco et al. (1992) in 95 % der spanischen Bestände STEC nach, wobei jedoch europaweit deutliche Unterschiede in der Prävalenz von STEC auftreten (Müffling et al., 2007).

Im Kolostrum wiesen Pirro et al. (1995) bei 84 bis 90 % der untersuchten Kühe neutralisierende Antikörper gegen Shigatoxin nach, bei Kälbern konnten sowohl Shigatoxintypen der Gruppe 1 als auch 2 nachgewiesen werden (Fröhlich et al., 2007). Im Gegensatz zur Kolostralmilch konnten STEC bei *E.-coli*-Mastitiden selten (Stephan und Kuhn, 1999) bzw. nicht (Cullor, 1997) detektiert werden. Der Erreger scheint für ausgewachsene Rinder apathogen zu sein und es kommt zu einem symptomlosen Trägertum (Naylor et al, 2005). Eine nachgewiesene Verbreitung innerhalb der Herde erfolgt unter anderem über kontaminiertes Trinkwasser (Shere et al., 1998). Nicht nur die Prävalenz, auch die Menge der ausgeschiedenen STEC variiert von Tier zu Tier. So konnten Ogden et al. (2004) individuelle und jahreszeitliche Schwankungen detektieren. In den warmen Monaten wurden mehr *E. coli* O157 pro g Fäzes ausgeschieden als in der restlichen Jahreszeit. Die Ausscheidungsrate bei einzelnen Tieren betrug dabei $>10^4$ KbE/g Fäzes (Omisakin et al., 2003). Die Prävalenz war im Gegensatz dazu jedoch in den kalten Monaten höher als in den warmen (Messelhäuser, 2005; Ogden et al, 2004). Edrington et al. (2006) führen diese

Schwankungen nicht auf die Temperatur zurück, sondern auf die Tageslichtlänge und die davon abhängig gesteuerte Produktion des Hormons Melatonin.

Eine Übertragung zwischen den verschiedenen Spezies, insbesondere zwischen Mensch und Rind, wurde aufgrund infektionsepidemiologischer Studien belegt (Murinda et al., 2004). Das Risiko einer humanen EHEC-Infektion steigt dabei nach Untersuchungen von Stark et al. (2007) pro 100 zusätzlich gehaltenen Rindern auf einer Fläche von einem Quadratkilometer um 68 %. Die Infektion des Menschen ist unter anderem über direkten Kontakt zu Tieren möglich, z. B. über den Besuch von Streichelzoos, von landwirtschaftlichen Betrieben oder über Ferien auf dem Bauernhof und zählt bei Kindern unter drei Jahren zum größten Risikofaktor für die Übertragung von EHEC (Conraths et al., 2004; Crump et al., 2002; Werber et al., 2007a). Für Schafe konnte eine Durchseuchung mit STEC von 20 bis zu 67 % des Bestandes nachgewiesen werden (Beutin et al., 1993; Gallien et al., 1994). Schafe werden vor allem als Reservoir für *Stx2d* und *Stx2_{aktivatable}* angesehen (Ramachandran et al., 2001; Tasara et al., 2008), jedoch wurden auch *stx2c*- und *stx1c*-tragende Stämme aus Schafen isoliert (Bürk et al., 2007; Espie et al., 2006). Die Schafe selbst zeigten dabei keinerlei Krankheitsanzeichen (Blanco et al., 2003).

Auch bei Ziegen verlief der STEC-Nachweis im Kot positiv, so berichteten Zschöck et al. (2000) von einer Durchseuchung von 75 % der untersuchten Ziegen, auf Bestandsebene wurden in einer Untersuchung von Vu-Khac und Cornick in 100 % der zentralvietnamesischen Ziegenbestände STEC nachgewiesen. Demgegenüber stehen Untersuchungen in Deutschland aus dem Jahr 2006, in welchen lediglich bei 8,3 % der untersuchten Einzeltiere VTEC nachgewiesen wurde (Hartung, 2008).

Neben den Haus- stellen jedoch auch die Wildwiederkäuer eine potenzielle STEC-Quelle dar. Nach einer Untersuchung von Lehmann et al. (2006) lag bei Reh-, Rot- und Damwild die Nachweisrate im Kot bei 52 %. Damit sind die Nachweisraten bei den Wildwiederkäuern vergleichbar mit denen der Hauswiederkäuer. Eine von Oliveira et al. (2007) durchgeführte Studie zum STEC-Vorkommen in brasilianischen Wasserbüffeln ergab Prävalenzraten von 0 bis 64 %, abhängig vom Bestand. Oliveira et al. (2007) führten die unterschiedliche Prävalenz dabei auf das jeweilige Betriebsmanagement zurück. Bemerkenswert ist, dass bei Kamelen bisher kein Nachweis von STEC geführt werden konnte (El-Sayed et al., 2007; Moore et al., 2002).

In einer von Goll (2005) durchgeführten Untersuchung an Pferden konnte bei 61 % der untersuchten Tiere *E. coli* O157 nachgewiesen werden. Bei Schweinen erfolgte in einer von Bauerfeind et al. (2004) durchgeführten Untersuchung bei 12 % der Tiere und 14 % der Bestände ein Nachweis von STEC. Alle 225 Isolate ließen sich dem Shigatoxintyp Stx2e und damit den "Edema Disease *E. coli*" zuordnen, den Erregern der Ödemkrankheit der Absatzferkel. Schierack et al. (2006) zeigten in einer Verlaufsuntersuchung an einer Zuchtschweinepopulation, dass virulenzgetragene *E.-coli*-Stämme als Teil der normalen Darmflora beim Schwein gesehen werden können und nicht notwendigerweise mit einem Pathogenitätsgeschehen einhergehen.

Neben den oben genannten Tieren wurden STEC unter anderem auch bei Wirtschaftsgeflügel, Vögeln und Kaninchen nachgewiesen (Garcia et al., 2002; Schouten et al., 2005; Wallace et al., 1997). Aus Taubenfäzes konnte Shigatoxintyp *stx2f* isoliert werden, welcher sich bei humanen Erkrankungen bisher nicht eruieren ließ (Friedrich et al., 2002b; Morabito et al., 2001; Schmidt et al., 2000).

Als mögliche Quellen für menschliche Erkrankungsfälle werden auch Haustiere gesehen. So konnte bei Hunden und Katzen STEC nachgewiesen werden (Busch et al., 2007a; Effenberger et al., 2007; Krause et al., 2005; Schraner et al., 2007; Trevena et al., 1996) und es ist ebenso auch eine Infektion der Haustiere über STEC-ausscheidende Menschen denkbar (Busch et al., 2007a).

Sasaki et al. (2000) konnten *E. coli* O157:H7 bei Fliegen und auch eine Vermehrung der Keime im Verdauungstrakt der Insekten nachweisen. Die Exkretion der Keime dauerte noch drei Tage nach Aufnahme an. Hausfliegen stellen somit nicht nur mechanische Vektoren für STEC dar, die anhaltende Ausscheidung der Keime erweitert die potenziellen Kontaminationsmöglichkeiten für Lebensmittel durch Insekten wesentlich. Untersuchungen von Ahmad et al. (2007) zeigten, dass Hausfliegen auch für die Verbreitung der STEC innerhalb der Rinderbestände eine wichtige Rolle spielen. So konnte bereits am Tag 1 nach Exposition mit *E.-coli*-O157:H7-tragenden Fliegen STEC in den Fäzes der Kälber und im Tränkewasser nachgewiesen werden.

2.4.2 Oberflächengewässer

Oberflächengewässer stellen eine weitere Infektionsquelle für EHEC-Erkrankungen dar (Ackman et al., 1997; Olsen et al., 2002) und sind nach einer bayerischen Fall-Kontroll-Studie vor allem für Kinder im Alter von drei bis neun Jahren als Risikofaktoren zu sehen (Heißenhuber et al., 2004). Als Ursprung des Infektionspotenzials wird der Eintrag von Fäkalien in Badegewässer - insbesondere durch Rinderkotabschwemmungen von Tierweiden sowie durch ausscheidende Badegäste - diskutiert. Besonders gefährdet sind hier Kleinkinder, welche um ein Vielfaches mehr Wasser beim Baden aufnehmen als Adulte. So wurde die EHEC-Infektion von 21 Kindern in Oregon (USA) auf Schwimmen in einem fäkal kontaminierten Badensee zurückgeführt (Keene et al., 1994).

Ein infektionsepidemiologischer Zusammenhang bestand auch zwischen einem EHEC-Ausbruch in einem englischen Ferienort und einem mit *E. coli* kontaminierten Fließgewässer. Der Eintrag von *E. coli* 0157 wurde hier auf eine oberhalb der Badestelle grasende Rinderherde zurückgeführt, deren Fäkalien durch starke Regenfälle in das Gewässer eingebracht wurden (Ihekweazu et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit der Kontamination von Oberflächengewässern mit STEC stellt der Eintrag durch Kläranlagen dar, da nur 44 % der im Zulauf vorhandenen STEC-Bakterien in der Kläranlage eliminiert werden (Burckhardt et al., 2005). Ungünstig wirkt sich hier die lange Überlebensfähigkeit in der Umwelt aus: Bei niedrigen Temperaturen konnten *E. coli* bis zu mehreren Wochen in Gewässern nachgewiesen werden (Maule, 2000), für *E. coli* O157 wurde ein Überleben von mehr als zehn Monaten beschrieben (Varma et al., 2003).

2.4.3 Lebensmittel

Für das Jahr 2007 wurden in Deutschland fünf lebensmittelbedingte EHEC-Ausbrüche durch das Robert Koch-Institut erfasst, davon ließen sich zwei auf Milch bzw. Milchprodukte zurückführen, für drei konnte eine Mahlzeit, jedoch kein bestimmtes Lebensmittel eingegrenzt werden. Die Belastung der Nahrungsmittel mit STEC erfolgt über eine Vielzahl von Möglichkeiten: Die Kontamination kann hierbei über eine fäkale Verunreinigung der Schlachtkörper beim Schlachtprozess, zum Beispiel beim Abzug des Fells oder beim Entfernen des Gastro-Intestinal-Trakts wie auch über eine Kontamination von Vegetabilien durch ausgebrachten tierischen Dünger oder eine Einbringung von EHEC-Keimen durch

infizierte Personen in das Lebensmittel erfolgen (Elder et al., 2000; Gareis et al., 2000; McEvoy et al., 2003).

Die direkte Übertragung von EHEC über Lebensmittel - insbesondere der Verzehr von streichfähigen Rohwürsten (Teewurst, Zwiebelmettwurst, Streichmettwurst) und Lammfleisch - erwies sich in einer von Werber et al. (2007a) durchgeführten Studie als hauptsächlicher Risikofaktor für Personen älter als zehn Jahre. Messelhäußer et al. (2007) konnten im Rahmen der amtlichen Untersuchung von Rohwürsten bei 2,5 % der Rohwürste einen positiven STEC-Nachweis führen. Eine Infektion über Rinderhackfleisch spielt mit 41 % der lebensmittelbedingten *E.-coli*-O157-Ausbrüche vor allem in den USA eine große Rolle (Rangel et al., 2005). Rindswurst wurde ebenfalls als Quelle für einen Ausbruch im Jahr 2007 in Dänemark vermutet und Schafsalami war Ursache eines Ausbruchs im Jahr 2006 in Norwegen (Ethelberg et al., 2007; Schimmer et al., 2008). Auch der größte europäische *E. coli*-O157:H7-Ausbruch in Zentralschottland im Jahr 1996 mit mehr als 500 Erkrankten wurde durch kontaminiertes Fleisch verursacht (Dundas et al., 2001).

Die EG-Verordnung Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel führt folgende Lebensmittelkategorien als besonders gefährlich in Bezug auf VTEC auf: „rohes oder nicht durcherhitztes Rindfleisch und möglicherweise auch Fleisch anderer Wiederkäuer, Hackfleisch/Faschiertes und gereiftes Rindfleisch sowie daraus hergestellte Erzeugnisse, Rohmilch und Rohmilcherzeugnisse, Frischerzeugnisse bzw. Rohkost, insbesondere Keimlinge und nicht pasteurisierte Obst- bzw. Gemüsesäfte“. Mit Bezug auf das Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health wird in der oben genannten EG-Verordnung auf die Bedeutung mikrobiologischer Leitlinien zur Verringerung der Fäkalkontamination für eine gleichzeitige Verringerung des VTEC-Risikos hingewiesen.

Der Verzehr von Rohmilch wurde von Werber et al. (2007) als einziger, mit Lebensmitteln assoziierter Risikofaktor für Kinder unter drei Jahren nachgewiesen. Rangel et al. (2005) konnten 4 % der US-amerikanischen O157:H7 Ausbrüche im Zeitraum von 1982 bis 2002 auf den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten zurückführen. Die Prävalenz für VTEC lag dabei nach Klie et al. (1997) bei 3,9 % in Rohmilch und 2,1 % in Vorzugsmilch. Eine bei 59 Kindern nach Besuch eines Ferienlagers 2006 in Niedersachsen aufgetretene EHEC-Infektion ließ sich nach epidemiologischen Recherchen mit dem Verzehr von Rohmilch als wahrscheinlicher Ursache assoziieren (Dreesman et al., 2007; N.N., 2008a). In

Zentralfrankreich konnte von Deschenes et al. (1996) auch Rohmilchkäse als auslösende Ursache von HUS-Erkrankungen nachgewiesen werden. Für Rohmilchkäse wurde von Zweifel et al. (2007) eine STEC-Prävalenz von 3,5 % festgestellt; dies entspricht somit in etwa der von Klie et al. (2007) festgestellten Prävalenz von STEC in Rohmilch. Die Einbringung der STEC-Bakterien in die Milch erfolgt vor allem über fäkale Kontamination während des Melkens. Diese Gefährdung kann, wie in einer taiwanesischen Studie gezeigt, durch verbesserte Prozesshygiene reduziert bzw. eliminiert werden (Chiueh et al., 2002).

Durch Kreuzkontamination kommt es auch bei wärmebehandelter Milch zu EHEC-Erkrankungen. So ließ sich die EHEC-Infektion von zwölf Kindern mit aus pasteurisierter Milch hergestellter Eiscreme in Belgien auf eine Kreuzkontamination durch Aushilfspersonal während der Herstellung der Eiscreme zurückführen. Der zusätzlich eingesetzte Mitarbeiter arbeitete aushilfsweise ohne Fachkenntnisse bei der Herstellung der Eiscreme mit und hatte Kontakt mit den Tieren des Hofes (De Schrijver et al., 2008). Eine in Großbritannien von der Süßwarenindustrie in Auftrag gegebene Studie zum Überleben von STEC in künstlich kontaminierter Schokolade konnte STEC bei einer Lagertemperatur von 10 °C noch nach 366 Tagen nachweisen (Baylis et al., 2004).

Die Kontamination von Lebensmitteln mit STEC durch Ausscheider im Personalbereich führte insbesondere im Bereich Fleischwaren zu groß angelegten Rückrufaktionen (Busch et al., 2005; Finke et al., 2006; Stolle, 2005). Dabei wurde von Busch et al. (2005) eine Keimbelastung von bis zu 1×10^4 KBE *E. coli*/g in verzehrfertigen Rohwürsten nachgewiesen. Durch Gareis et al. (2000) erfolgte der Nachweis einer STEC-Ausscheidungsdauer von annähernd zehn Monaten bei einem Mitarbeiter eines fleischverarbeitenden Betriebes, Oberparleiter et al. (2007) konnten sogar eine Ausscheidungsdauer von mehreren Jahren belegen. Damit wurde belegt, dass das verarbeitende Personal eine wichtige Kontaminationsquelle darstellt und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden müssen.

Ebenfalls wichtig im Bereich der Lebensmittelkontamination mit STEC ist die Kreuzkontamination durch Bedarfsgegenstände, wie etwa kontaminierte Edelstahloberflächen oder Plastik (Rivas et al., 2007, Wachtel et al., 2003). Das Abspülen der mit STEC kontaminierten Bedarfsgegenstände mit 38 bis 48 °C warmem Seifenwasser zeigte in einer Untersuchung von Mattick et al. (2003) keinen Erfolg. Nach dem Reinigungsprozess wurde

bei allen Geschirrtteilen weiterhin eine STEC-Kontamination nachgewiesen und zusätzlich waren die Spül- und Trockenutensilien mit STEC behaftet. Einen Überblick über den STEC-Nachweis in Lebensmittelplanproben der letzten Jahre gibt die Tabelle 2.

Lebensmittelplanproben	STEC-positiv in % (Zahlen gerundet)			
	2006	2005	2004	2003
Fleisch ohne Geflügel, gesamt	5,2 (n = 499)	6,7 (n = 535)	12,6 (n = 349)	3,6 (n = 614)
Rindfleisch	4,5 (n = 177)	1,3 (n = 155)	2,1 (n = 140)	3,1 (n = 197)
Schweinefleisch	0,7 (n = 148)	2,2 (n = 46)	3,5 (n = 29)	0,0 (n = 80)
Schafffleisch	11,1 (n = 36)	0,0 (n = 33)	6,7 (n = 15)	12,5 (n = 8)
Wildfleisch	9,9 (n = 121)	14,8 (n = 162)	25,3 (n = 154)	14,8 (n = 81)
Rohfleisch, zerkleinert	2,3 (n = 129)	13,6 (n = 88)	7,4 (n = 108)	3,8 (n = 80)
Rohfleisch u. -erzeugnisse	5,2 (n = 692)	5,2 (n = 732)	3,2 (n = 729)	2,2 (n = 1382)
anders, als durch Hitze stabilisierte Fleischerzeugnisse	1,8 (n = 1006)	0,7 (n = 399)	0,0 (n = 182)	2,2 (n = 494)
Rohmilch ab Hof	0,6 (n = 324)	1,9 (n = 2681)	2,4 (n = 205)	0,1 (n = 818)
Rohmilch-Weichkäse	0,0 (n = 69)	2,3 (n = 43)	2,0 (n = 51)	15,8 (n = 19)

Tabelle 2: STEC-Nachweis bei Lebensmittelplanproben (Hartung, 2005; 2006; 2007a; 2007b, 2008)

Aber auch pflanzliche Lebensmittel - wie nicht pasteurisierter Apfelsaft, Sprossen, Salat oder anderes Gemüse - können als Infektionsquelle dienen (Michino et al., 1999; Solomon et al.; 2002, Watanabe et al., 1996). So ließen sich Infektionen durch Apfelsaft auf ungewaschen verarbeitetes Fallobst zurückführen, welches durch fäkal verunreinigtes Abwasser, Oberflächenwasser oder die Ausbringung tierischen/menschlichen Düngers kontaminiert

wurde (Besser et al., 1993). Zwei Ausbrüche in den USA im Jahr 2006 ließen sich auf Gemüse, unter anderem Spinat, als Infektionsquelle zurückführen (Grant et al., 2008; N.N., 2006b; Maki, 2006). Mindestens 70 Personen (N.N. 2007a) betraf eine Erkrankungswelle verursacht durch Kopfsalat kurze Zeit später ebenfalls in den USA. In Skandinavien erkrankten in den Jahren 2005 sowie 2007 mindestens 135 sowie 36 Personen ebenfalls durch den Verzehr von Kopfsalat (Söderström et al., 2005; Söderström et al., 2008; Friesema et al., 2007). Die Kontamination des Salats mit STEC erfolgte durch die in Schweden übliche Verwendung von Gießwasser aus Fließgewässern. Die Gefährdung für den Eintrag von STEC ist in diesem Fall auch deutlich von der STEC-Prävalenz innerhalb der lokalen Rinderpopulation und der Witterung abhängig (Söderström et al., 2008). Ein besonderes Gefahrenpotenzial stellt die Fähigkeit der Einlagerung von STEC-Bakterien in pflanzliches Gewebe nach der Aufnahme über Wasser bzw. den Erdboden dar, da allgemeine Hygienemaßnahmen, wie das Waschen von Rohkost vor dem Verzehr, in diesem Fall nicht greifen (Grant et al., 2008; Itoh et al., 1998; Solomon et al., 2002).

2.4.4 Trinkwasser

Untersuchungen am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit ergaben für den Zeitraum 1998 bis 2002 bei Trinkwasserverdachtsproben mit einem Vorbefund von mind. 200 KbE *E. coli*/100 ml bei 72 (5,9 %) von 1220 Proben einen positiven STEC-Befund und zeigten damit, dass Trinkwasser als Infektionsquelle für EHEC-Infektionen epidemiologisch bedeutsam sein kann (Morlock et al., 2004). Eine indische Studie zur Prävalenz von STEC in Trinkwasser erbrachte den Nachweis von STEC in 2,7 % der untersuchten und in 8,8 % der mit *E. coli* vorbelasteten Proben (Ramteke und Tewari, 2007). Die Überlebensdauer von *E. coli* O157:H7 in Trinkwasser beträgt dabei nach Warburton et al. (1998) fast ein Jahr. Rangel et al. (2005) konnten in einer epidemiologischen Untersuchung in 15 % der EHEC-Erkrankungen Trinkwasser als Infektionsursache nachweisen. Über einen der bisher größten Ausbrüche im Bereich Trinkwasser berichtete Holme (2003): Über 2300 Personen erkrankten im Jahr 2000 in Walkerton, Kanada, durch mit Fäkalien kontaminiertes Trinkwasser als Infektionsquelle.

2.4.5 Mensch-zu-Mensch-Übertragungen

Die Übertragung von Mensch zu Mensch stellt gerade bei Kindern unter drei Jahren eine wichtige Infektionsquelle dar (Huber et al., 1998; Werber et al., 2004). Besonders bedeutend ist hier die fäkal-orale Übertragung durch durchfallerkrankte oder STEC-ausscheidende

symptomlose Familienmitglieder (Doorduyn et al., 2006; Heißenhuber et al., 2004; Ludwig et al., 2002; Orth et al., 2006). Für Patienten mit Diarrhö oder hämorrhagischer Colitis wurde eine durchschnittliche Ausscheidungsdauer von 13 Tagen (2 bis 62) nachgewiesen (Karch et al., 1995). Werber et al. (2007b) konnten in einer Kohortentudie zu sekundären Haushaltsübertragungen in 21 % der untersuchten Haushalte weitere EHEC-Erkrankungen belegen, davon zu 56 % Geschwisterkinder. Karch et al. (1995) konnten in einer Studie 13 % der *E.-coli*-O157-ausscheidenden Kinder als Langzeitausscheider detektieren. Dabei verlief die Infektion gegen Ende der Ausscheidungsdauer symptomlos. Ein Ausbruch in einer Kindertagesstätte in Norddeutschland mit 41 Erkrankten und einem Todesfall ließ sich unter anderem auf asymptomatische Ausscheider innerhalb des Personals zurückführen (Reida et al., 1994).

2.5 Klinisches Bild einer EHEC-Infektion

Eine Infektion mit EHEC-Bakterien kann zu lokaler oder systemischer Erkrankung führen (Karmali, 1989), jedoch verläuft ein großer Teil ganz ohne klinische Auffälligkeit und bleibt daher unerkant (N.N., 2008a). Wesentlichen Einfluss auf den Verlauf einer EHEC-Infektion haben Alter des Patienten, Immunstatus, Toxinvariante, genetische Faktoren, Infektionsdosis und weitere Virulenzfaktoren (Griffin und Tauxe, 1991; Honda, 1999). Mit über 50 % der Erkrankten sind vor allem Kleinkinder im Alter von einem bis zu fünf Jahren betroffen (Frank und Werber, 2007). Bei einer Inkubationszeit von einem bis zu drei Tagen (teilweise bis zu acht Tagen) beginnt die Erkrankung mit wässrigen Durchfällen, die zunehmend blutig erscheinen können. Weitere Symptome können Übelkeit, Erbrechen, krampfartige Bauchschmerzen und in seltenen Fällen Fieber sein. In etwa 80 % der Fälle heilt die Erkrankung ohne Komplikationen in einer Woche aus. 10 bis 20 % der Erkrankten entwickeln eine hämorrhagische Colitis mit den charakteristischen Symptomen wie Leibschmerzen und blutigem Stuhl, teilweise auch mit Fieber. Bei 5 bis 10 % der Erkrankten, insbesondere bei Kleinkindern, kommt es zu extraintestinalen Komplikationen (Zimmerhackl et al., 2002). Das enteropathische Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) als postinfektiöse Komplikation der EHEC-Erkrankung stellt die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter dar. Es ist durch einen biphasischen Verlauf gekennzeichnet. Dabei folgt nach einem kurzen Intervall, unabhängig von der Schwere der vorausgegangenen enteralen Symptomatik, eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Vomitus, Schmerzen im Abdominalbereich, Ikterus und Petechien. Das Bild des HUS besteht aus der Symptomentrias Thrombozytopenie, hämolytische Anämie und akutem Nierenversagen (Johnson und Taylor,

2008; Wong et al, 2000). Die ärztliche Diagnose wird im Schnitt 6,3 Tage nach primärem Erkrankungsbeginn gestellt (Heißenhuber et al., 2007). In bis zu 5 % der Fälle verläuft die Erkrankung tödlich (N.N., 2008a). Als Langzeitfolgen treten bei bis zu 50 % der HUS-Patienten bleibende oder Spätschäden, wie arterielle Hypertonie, neurologische Ausfälle, chronische Pankreatitis oder Niereninsuffizienz auf (Garg et al., 2003; Karch et al., 1996; Karch et al., 2000). Die Therapie besteht aus der symptomatischen Behandlung, vor allem ausreichender Rehydratation, die Anwendung von Antibiotika ist kontraindiziert (Iijima et al., 2008; Wong et al., 2000).

2.6 Labordiagnostischer Nachweis

In mehr als 90 % aller humanen Stuhlproben werden *E. coli* nachgewiesen, bei EHEC-Ausscheidern können dabei auf ein ausgeschiedenes EHEC-Bakterium ca. 200 bis 300 apathogene *E.-coli*-Bakterien kommen (Karch et al., 1996). Die EHEC-Diagnostik ist daher auf den Nachweis des gemeinsamen Merkmals aller EHEC, der Fähigkeit zur Bildung von Shigatoxinen, ausgerichtet. Dies geschieht durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden wie Polymerasekettenreaktion (PCR) und Kolonieblot-Hybridisierung oder phänotypisch über den Nachweis des Shigatoxins durch Enzymimmunoassays (Fruth et al., 2000; Sharma, 2002). Ein Vergleich der Nachweismethoden ELISA, Verozelltest, PCR und immunomagnetische Separation durch Kugler et al. (1998) zeigte die PCR als sensitivstes System. Bis zur Ausbildung des HUS kann jedoch die Ausscheidung der Bakterien im Stuhl bereits gering oder beendet sein, so dass der Nachweis der EHEC dann unter Umständen nicht mehr möglich ist (Friedrich, 2002a, Friedrich et al., 2002c). In diesen Fällen stehen serologische Untersuchungen, beispielsweise gebildete Antikörper, zur Aufklärung der Infektion im Vordergrund (Friedrich et al., 2002c).

Zur einheitlichen Diagnostik wurde vom gemeinsamen Arbeitskreis "EHEC" des Robert Koch-Instituts und des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (jetzt Bundesinstitut für Risikobewertung) mit Unterstützung der Fachgruppe "Gastrointestinale Infektionen" der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie ein Stufenplan für die Untersuchung humaner Stuhlproben entwickelt. Die Kosten für die Laboruntersuchung werden in diesem Zusammenhang, da es sich um eine Erkrankung mit gesetzlicher Meldepflicht handelt, von der Berechnung des Wirtschaftlichkeitsbonus des Arztes ausgenommen (N.N., 2000b).

Ziel der Diagnostik ist ein schnelles und sicheres Untersuchungsergebnis, welches es dem Labor ermöglicht, dem behandelnden Mediziner und dem Gesundheitsamt den Verdacht auf eine EHEC-Infektion innerhalb von eineinhalb Tagen nach Eingang der Stuhlprobe zu melden. Zum Screening auf Shigatoxinbildner dient der Nachweis mittels ELISA (Erste Stufe). Die weitere Bestätigung des Befundes mit der PCR und eine Isolierung des Erregers erfolgt in der Regel durch Speziallaboratorien (Zweite Stufe). Abschließend wird das Isolat durch das nationale Referenzzentrum mittels Lysotypie, Genotypie, Serotypie und der Bestimmung weiterer Pathogenitätsfaktoren feintypisiert (Dritte Stufe). Dieser Schritt ermöglicht später die epidemiologische Auswertung der Daten und eine Aufklärung der Infektketten (Fruth et al., 2000). Eine EHEC-Infektion gilt nach den Falldefinitionen des RKI dabei durch den labordiagnostischen Gen-Nachweis als bestätigt, unabhängig davon, ob der Nachweis aus der Stuhlanreicherung, der Mischkultur oder aus dem Isolat erfolgte. Die Erregerisolierung aus dem Stuhl gilt nur in Verbindung mit dem Toxinnachweis mittels ELISA aus der *E.-coli*-Kultur als labordiagnostisch nachgewiesen.

Die labordiagnostische Vorgehensweise zu Nachweis und Isolation der VTEC aus Lebensmitteln wird durch die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (Methode L 07.18-1) geregelt. Die Probe wird wie folgt vorbereitet: Probenmaterial wird mit modifizierter Tryptose-Soja-Bouillon mit Novobiocinzusatz im Stomacher zerkleinert. Auf die Probenvorbereitung folgt eine Voranreicherung als Schüttelkultur mit anschließender Anreicherung in modifizierter Tryptose-Soja-Bouillon im Inkubationsschüttler. Für die Untersuchung werden die Proben mittels Nukleinsäureextraktion aufbereitet, in der PCR die gesuchten Nukleinsäuresequenzen amplifiziert und die erhaltenen Amplifikate anschließend detektiert. Mittels Kolonieblot-DNA-Hybridisierung werden die VTEC identifiziert. Die Ergebnisse werden über die Bestätigung des *stx*-Nachweises mittels PCR verifiziert. Eine weitergehende Charakterisierung, wie Subtypisierung und Nachweis der Virulenzfaktoren *eae* und *hly*, erfolgt ebenfalls mittels PCR. Zur Aufklärung von Infektketten, unter anderem über die Bestimmung des Serovars, werden die Isolate weitergehend geprüft (Gallien et al., 2001).

2.7 Rechtlicher Hintergrund

Zur Beurteilung des Nachweises von STEC in Lebensmitteln, basierend auf dem Toxinnachweis bzw. Gennachweis in Verbindung mit der Kultur, wurde vom Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene tätigen Sachverständigen (ALTS) eine Empfehlung

erarbeitet (Bräunig, 2001). Unter der Prämisse, dass "alle VTEC als potentielle EHEC anzusehen sind", ist eine Beurteilung nach Artikel 14 Absatz 1 in Verbindung mit Absatz 2a der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 als "gesundheitsschädlich" für verzehrsfertige Produkte möglich. Des Weiteren ist die Überprüfung der Charge nach Artikel 14 Absatz 6 Verordnung (EG) Nr. 178/2002 sowie gegebenenfalls die Rücknahme der betroffenen Charge aus dem Markt nach Artikel 19 Absatz 1 Verordnung (EG) Nr. 178/2002 und die Veranlassung einer EU-Schnellwarnung nach Artikel 50 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zu prüfen (Bülte, 2000; Diepolder, 2007; Pastari, 2007; Renz, 2006, 2007; Stolle, 2005). Hierbei ist insbesondere auch die Gefahr von Kreuzkontaminationen im Haushalt zu beachten (Weyland und Stiebing, 2007).

Der direkte oder indirekte Nachweis von EHEC bei Personen ist nach § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG, 2001) meldepflichtig. Gemäß den Falldefinitionen des RKI umfasst dies die klinisch-epidemiologisch bestätigte Erkrankung, die klinisch-labordiagnostisch bestätigte Erkrankung sowie die labordiagnostisch nachgewiesene Infektion mit nicht erfülltem klinischen Krankheitsbild bzw. unbekanntem klinischen Bild. Damit sind auch asymptomatische Infektionen namentlich meldepflichtig. Der epidemiologisch bestätigte Nachweis wird definiert als Übertragung Mensch-zu-Mensch, Baden in kontaminiertem Gewässer, Kontakt mit STEC-ausscheidenden Tieren bzw. Verzehr der von diesem Tier stammenden Lebensmittel oder Verzehr mit STEC-kontaminierter Lebensmittel jeweils mit labordiagnostischem Gen-Nachweis und unter Berücksichtigung der Inkubationszeit (N.N., 2007b).

Ebenso besteht nach § 6 IfSG (2001) Meldepflicht für den Krankheitsverdacht, definiert als „klinisches Bild einer EHEC-Erkrankung mit alleinigem Shigatoxin-Nachweis in der Stuhlanreicherungskultur bei negativem kulturellem Nachweis und ohne epidemiologische Bestätigung“ (N.N., 2007b).

Nach § 29 IfSG (2001) können Kranke, Krankheitsverdächtige, Ansteckungsverdächtige und Ausscheider einer behördlichen Beobachtung unterworfen und dieser Personengruppe die Ausübung bestimmter beruflicher Tätigkeiten, insbesondere in Gemeinschaftseinrichtungen und beim Umgang mit Lebensmitteln, untersagt werden. Dies betrifft vor allem folgende Lebensmittel: "Fleisch, Geflügelfleisch und Erzeugnisse daraus, Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis, Fische, Krebse oder Weichtiere und Erzeugnisse daraus, Eiprodukte, Säuglings-

und Kleinkindernahrung, Speiseeis und Speiseeishalberzeugnisse, Backwaren mit nicht durchgebackener oder durcherhitzter Füllung oder Auflage, Feinkost-, Rohkost- und Kartoffelsalate, Marinaden, Mayonnaisen, andere emulgierte Soßen und Nahrungshefen" [§§ 31, 34, 42 IfSG (2001)]. Der dadurch entstehende Verdienstausschlag wird nach § 56 IfSG (2001) entschädigt.

Die Erfassung der Daten über das „Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern“ sowie die „epidemiologische Untersuchung lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche“ wird auf europäischer Ebene durch die Zoonosen-Überwachungsrichtlinie 2003/99 geregelt und die erhobenen Daten werden durch das "European Centre for Disease Prevention and Control" ausgewertet.

2.8 Molekularbiologische Nachweismethoden

2.8.1 Polymerasekettenreaktion

Kary Banks Mullis hatte 1983 die Idee, DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase künstlich zu vervielfältigen. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierung bei 95 °C trennen sich die beiden Stränge der als Vorlage dienenden DNA durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstränge. Im nachfolgenden Schritt wird die Temperatur auf die Annealingtemperatur der spezifischen Primer gesenkt, so dass sich diese an die komplementären Sequenzen der einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der gewählten Primer. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 72 °C erhitzt, das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Die Polymerase verlängert in der Elongationsphase die Primer in der 5' - 3'-Richtung, wobei die Sequenz durch die als Matrix dienende einzelsträngige DNA vorgegeben ist. Aus ursprünglich einer doppelsträngigen DNA entstehen so zwei neue doppelsträngige DNAs. Durch die Wiederholung des Zyklus verdoppelt sich die Menge der DNA-Abschnitte, so dass es im Laufe der Untersuchung zu einer exponentiellen Zunahme des Amplifikates kommt (Mühlhardt, 2003; Saiki et al., 1988). Als Ausgangsmaterial werden die zu vervielfältigende DNA, Primer, hitzebeständige DNA-Polymerase, dNTP-Mix, MgCl₂, Reaktionspuffer und H₂O benötigt. Die PCR wird mittels sogenannter Thermocycler durchgeführt, welche den PCR-Reaktionsansatz präzise auf die jeweilige Temperatur erhitzen und kühlen. Im Anschluss an die Vervielfältigung wird das erhaltene PCR-Produkt durch eine

Agarosegelelektrophorese mit darauffolgender Ethidiumbromidfärbung unter Ultraviolett-Licht sichtbar gemacht. Die Auftrennung der einzelnen Amplifikate im elektrischen Feld erfolgt dabei der Größe nach. Ethidiumbromid, ein organischer Farbstoff, interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur in die dsDNA, dabei nimmt die Fluoreszenzemission zu (Brown, 2002; Fallert-Müller, 1999).

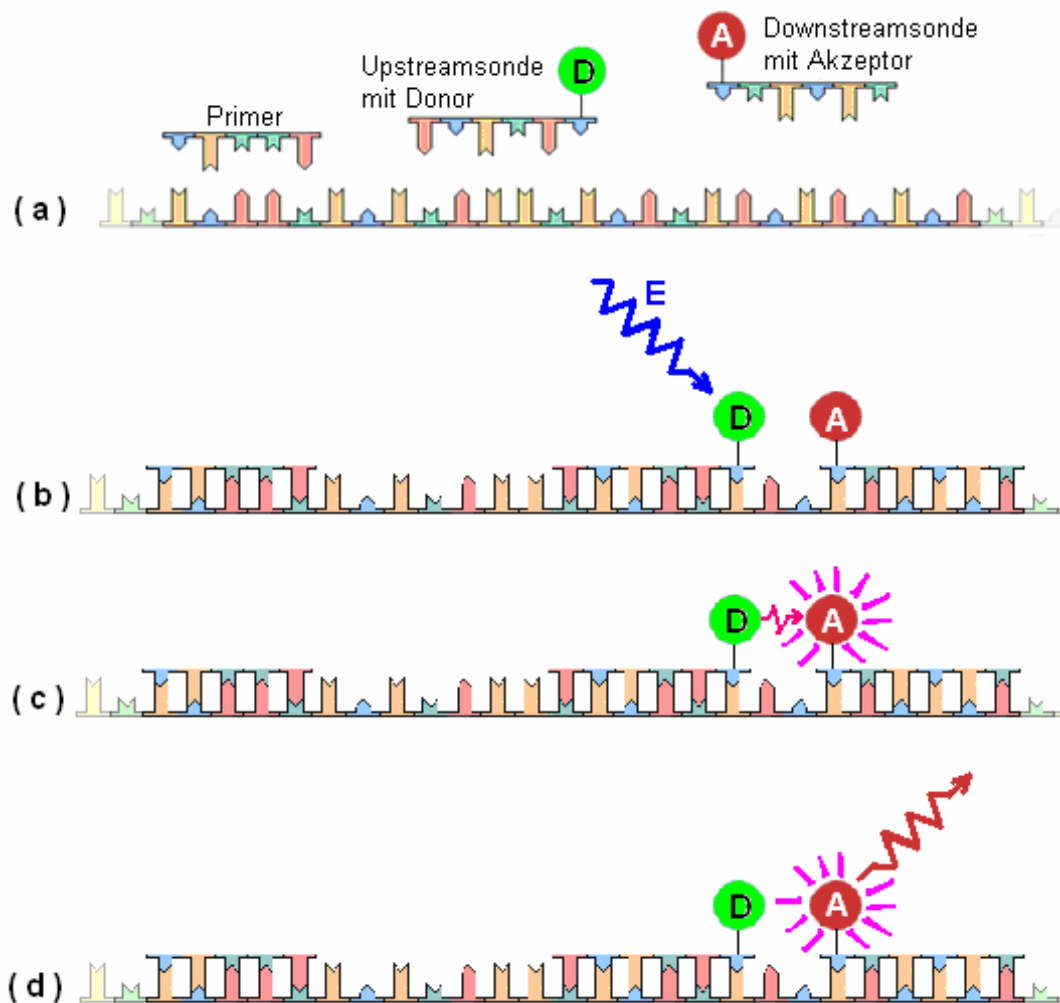
2.8.2 Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler[®]

Die Real-Time-PCR ist eine Echtzeit-PCR, die Detektion der PCR-Produkte findet hier im Gegensatz zur konventionellen PCR nicht nach, sondern bereits während der Vervielfältigung statt (Gingeras et al., 2005; Higuchi et al., 1992; 1993). Der in dieser Arbeit verwendete LightCycler[®], ein Thermocycler mit integriertem Fluorometer, ermöglicht die Darstellung des Fluoreszenzsignals in Echtzeit. Das dem Prozess zugrundeliegende Prinzip wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet (De Silva et al., 1998). Dieser 1948 erstmals von dem Physiker Theodor Förster beschriebene Vorgang beruht auf der Tatsache, dass die Energie eines angeregten Donor-Fluorophors durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen strahlungslos über eine Entfernung von 10 bis 100 Å auf einen fluoreszierenden Akzeptor übertragen wird. Voraussetzung hierfür ist, dass sich Emissions- und Absorptionsspektren von Donor und Akzeptor überlappen und sich die beiden Moleküle in räumlicher Nähe befinden, da die Effizienz des Energietransfers mit zunehmender Entfernung stark abnimmt (Cardullo et al., 1988; Förster, 1948; Kubista et al., 2006).

Zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale werden zwei Sonden eingesetzt. Dies sind fluorophormarkierte Oligonukleotide, welche komplementär zur Zielsequenz sind. Die Upstream-Hybridisierungssonde ist am 3'-Ende mit einem Donorfluorochrom, die Downstream-Sonde am 5'-Ende mit einem Akzeptorfluorochrom versehen (siehe Grafik 5a). Die beiden Sonden lagern sich an den komplementären DNA-Strang an und werden so gewählt, dass sie in einem Abstand von wenigen Nukleotiden zueinander hybridisieren. In der Annealingphase hybridisieren zuerst Sonden und dann Primer Sonden mit der Zielsequenz des zuvor gebildeten PCR-Produkts. Der Donor wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt (siehe Grafik 5b), die dadurch übertragene Energie wird vom Donor an den benachbarten Akzeptor mittels FRET weitergeleitet (siehe Grafik 5c). Die vom Akzeptor empfangene Energie wird als Fluoreszenzsignal einer spezifischen Wellenlänge abgegeben (siehe Grafik 5d) und durch das Fluorometer am Ende jeder Annealingphase erfasst.

Fluoreszenzemission ist nur nachweisbar, wenn beide Sonden an die Zielsequenz gebunden sind. Dabei verhält sich das FRET-Signal proportional zur Menge des für die Hybridisierung verfügbaren PCR-Produkts, sodass das Signal nach jedem Zyklus ansteigt.

Während der Elongation verdrängt die *Taq*-Polymerase die Hybridisierungssonden, die intakt bleiben und für die nächste Annealingphase wieder zur Verfügung stehen (Gingeras et al., 2005; Livak et al., 1995; Wittwer et al., 1997).



Grafik 5: Erzeugung der Fluoreszenzsignale mit Hybridisierungssonden (N.N., 2008b)

Als Schmelzpunkt (T_m) wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der eine doppelsträngige DNA zu 50 % in Einzelstränge aufgetrennt wird. Die Trennung des Doppelstranges erfolgt durch die Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren. Zwischen Guanin und Cytosin werden drei und zwischen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen gebildet, daraus folgt, dass sich der Guanin-Cytosin-Gehalt der DNA und die T_m in einer linearen Beziehung zueinander befinden (De Silva, 1998).

Die Schmelzkurvenanalyse wird im Anschluss an die PCR-Untersuchung durchgeführt, dabei wird nach der Amplifikation die Temperatur in der Reaktionskammer des Thermocyclers langsam erhöht (0,1 - 0,2 °C/sec) und kontinuierlich das Fluoreszenzsignal gemessen. Sind beide Sonden gebunden, wird Fluoreszenz emittiert, bei Erreichen des Schmelzpunktes lösen sich die Sonden ab und die Fluoreszenz fällt abrupt ab. Dieser Punkt wird als Schmelztemperatur bezeichnet und stellt mathematisch das Maximum der ersten negativen Ableitung ($-dF/dT$) der Schmelzkurve dar (Kubista et al., 2006).

Unterschiedliche Schmelztemperaturen ermöglichen die Differenzierung der einzelnen Shigatoxintypen (Reischl et al., 2002). Mit der Schmelzkurvenanalyse ist auch die Analyse von Mutationen innerhalb der Hybridisierungsbereiche der Sonden möglich, da die Schmelztemperatur neben der Länge und dem Guanodin-Cytosin-Gehalt der Hybridisierungssonde auch vom Homologiegrad des Hybrids abhängig ist (Aoshima et al., 2000; Gingeras et al., 2005; Lipsky et al., 2001).

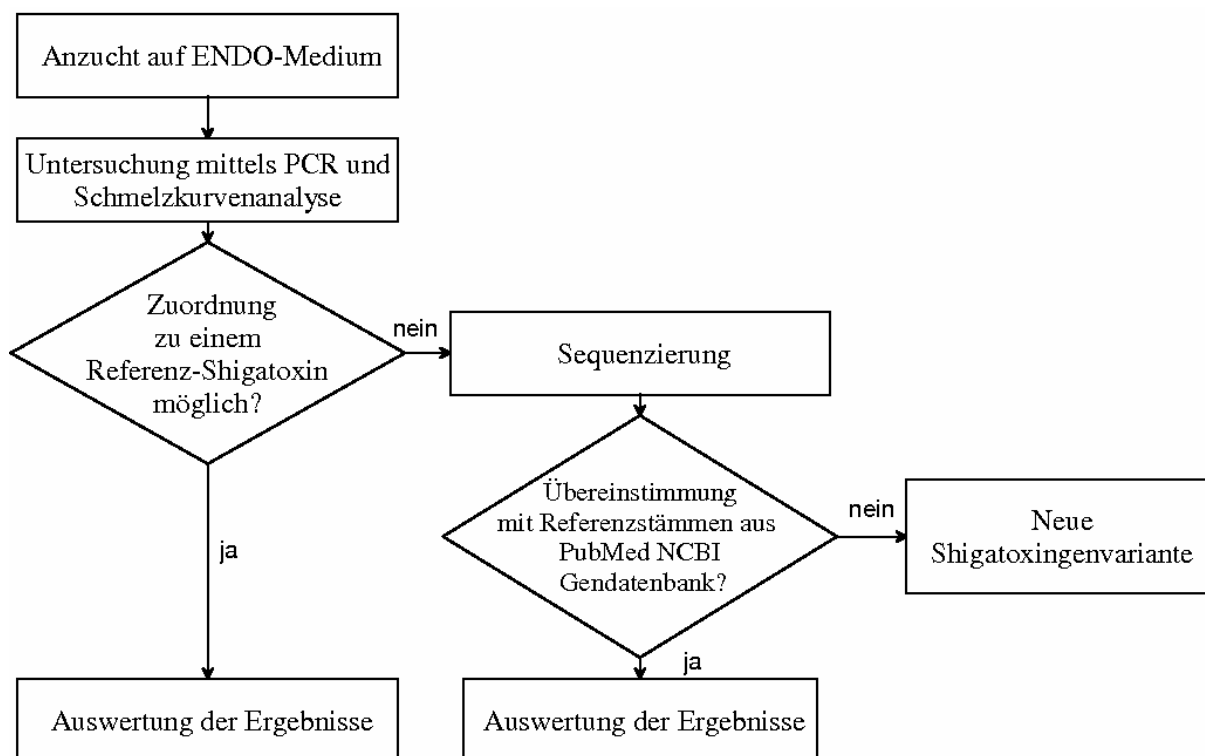
2.8.3 Sequenzierung nach Sanger (Didesoxynukleotidmethode)

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger funktioniert auf enzymatischer Basis und ähnelt im Prinzip der Polymerasekettenreaktion: Die zu analysierende DNA wird in Einzelstränge denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und durch die Polymerase verlängert. Zusätzlich zu den Desoxynukleotiden (dNTPs) enthält der Sequenzierungsansatz auch Didesoxynukleotide (ddNTPs). Die *Taq*-Polymerase akzeptiert dabei sowohl die dNTPs als auch die ddNTPs zur Elongation. Den ddNTPs fehlt jedoch die Hydroxylgruppe zur Verbindung mit dem nächsten Nukleotid, sodass ein Kettenabbruch erfolgt. Der Anfang eines neusynthetisierten Stranges wird vom dNTP gebildet und das Ende vom ddNTP. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Stränge mit einem ddNTP am jeweiligen 3'-Ende (Sanger et al., 1977). Für die maschinelle Auslesung der Sequenz werden fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs verwendet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden während der elektrophoretischen Auftrennung in einem Polymer durch einen Laserstrahl zum Fluoreszieren angeregt und mit einer CCD-Kamera detektiert. Jedes ddNTP ist mit einem anderen spezifischen Farbstoff markiert und die so erhaltene Sequenz wird als vierfarbiges Chromatogramm dargestellt (Meckelein und Frey, 2003; Hutchison, 2007).

3. Material und Methoden

3.1 Ziele und Vorgehensweise

Ziel dieser Arbeit war es, eine Übersicht über die Verteilung der verschiedenen Shigatoxintypen in Lebensmitteln, Oberflächenwasser, Trinkwasser und tierischen Fäzes zu erhalten. Dafür wurden STEC-Isolate des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) mit der Methode Real-Time-PCR untersucht und die Shigatoxingene den jeweiligen mituntersuchten Referenz-Shigatoxintypen durch Schmelzkurvenanalyse zugeordnet. Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden stichprobenweise mit der konventionellen PCR überprüft. Einige der Isolate, welche sich nicht den mituntersuchten Referenzen zuordnen ließen, wurden exemplarisch sequenziert. Die Vorgehensweise wird in nachfolgender Grafik 6 als Flussdiagramm dargestellt:



Grafik 6: Vorgehensweise in der vorliegenden Studie

3.2 Untersuchungsmaterialien

Die untersuchten 349 Isolate stammen aus Oberflächenwasser, Trinkwasser, tierischen Fäzes und verschiedenen Lebensmitteln. Zusätzlich wurden Isolate aus humanen Stuhlproben aufbauend auf den Ergebnissen der Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse von G. Lang untersucht (eine Übersicht zeigt Tabelle 3). Die verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte sind im Anhang gelistet.

Anzahl	Matrix
157	Tierische Fäzesr
109	Oberflächenwasser
57	Trinkwasser
21	Lebensmittel
5	Humane Stuhlproben

Tabelle 3: Untersuchte Isolate

3.3 PCR-Untersuchung und Schmelzkurvenanalyse

3.3.1 Vorbereitung

Für die Untersuchungen wurden Isolate der Stammsammlung des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit aus der Kryobank unter sterilen Kautelen entnommen und auf ENDO-Medium (Fa. Oxoid, D) über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Bakterien wurden koloniemorphologisch auf Reinheit überprüft und anschließend eine Kolonie in 200 µl 0,9 %ige sterile Kochsalzlösung suspendiert. Von dieser Bakterien-suspension wurden 20 µl in 400 µl Aqua dest. pipettiert. Die Proben wurden gemischt und bei 95 °C im Thermomixer (Fa. Eppendorf, D) für 15 min erhitzt, um die Bakterien abzutöten und die DNA freizusetzen. Anschließend wurde der DNA-Extrakt für 10 s bei 1400 Umdrehungen/min in der Zentrifuge (Fa. Eppendorf, D) zentrifugiert, um Kreuzkontaminationen durch Kondenswasserbildung am Deckel zu vermeiden und störende Zellreste am Boden zu sammeln.

In jedem PCR-Untersuchungsgang wurden Positiv- und Negativkontrollen mituntersucht. Eine Übersicht über die verwendeten Kontrollstämme zeigt die Tabelle 4.

Bezeichnung	Accession-Nr.	Größe (bp)	Literatur
<i>stx1</i> 933J	AB015056	1238	Strockbine et al., 1986
<i>stx1c</i> 6592/02	Z36901	1434	Paton et al., 1995
<i>stx1d</i> MHI 813	AY170851	1271	Bürk et al., 2003
<i>stx2</i> O157:H7 EDL 933	AEOO5174	1241	Perna et al., 2001
<i>stx2c</i> E32511	M59432	1499	Schmidt et al., 1996
<i>stx2d</i> -Ount EH250	AF043627	1470	Pierard et al., 1998
<i>stx2e</i> E57 O138	X81416	1236	Franke et al., 1995
<i>E. coli</i> ATCC 11775	Negativkontrolle		

Tabelle 4: Kontrollstämme

3.3.2 Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler®

Vom DNA-Extrakt wurden 2 µl zu 18 µl des Mastermixes in Glaskapillaren pipettiert, 10 s zentrifugiert (Fa. Roche, D) und im LightCycler® (Fa. Roche, D) amplifiziert. Der Mastermix ist in Tabelle 5 aufgelistet. Das Protokoll der PCR-Untersuchung ist in Tabelle 20 dargestellt, die Sequenzen der Sonden und Primer in Tabelle 7 und 19.

Komponente	Konzentration	Menge (µ l/Ansatz)	Endkonzentration (20-µ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	7,6	---
FastStart DNA Master HybProbe	---	2,0	---
MgCl ₂ -Lösung	25 mM	2,4	3,0 mM
Primer STEC-1	10 µM	1,0	0,5 µM
Primer STEC-2	10 µM	1,0	0,5 µM
Sonde STEC-I HP1	4 pmol/µl	1,0	0,2 µM
Sonde STEC-I HP2	4 pmol/µl	1,0	0,2 µM
Sonde STEC-II HP1	4 pmol/µl	1,0	0,2 µM
Sonde STEC-II HP2	4 pmol/µl	1,0	0,2 µM

Tabelle 5: Mastermix für die Real-Time-PCR

Die Primer STEC-1 und STEC-2 binden sowohl die Shigatoxingruppe 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*) als auch die Shigatoxingruppe 2 (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*). Die Erfassung der Shigatoxingruppe 1 erfolgte mit den Sonden STEC-I HP1 bzw. STEC-I HP2, die Detektion der Shigatoxingruppe 2 erfolgte mit den Sonden STEC-II HP1 bzw. STEC-II HP2.

Die Detektion der einzelnen Shigatoxintypen erfolgte im Anschluss an die PCR-Amplifikation mit der Schmelzkurvenanalyse (Protokoll siehe Tabelle 6). Die Isolate ließen sich durch mit den Referenzstämmen übereinstimmenden Schmelztemperaturen den einzelnen Shigatoxintypen zuordnen. Isolate mit abweichenden Schmelztemperaturen deuteten auf eine abweichende Nukleotidsequenz zum jeweiligen Referenzstamm innerhalb des Hybridisierungsbereiches der Sonden und konnten so detektiert werden.

Temperaturveränderung (°C/s)	Zieltemperatur (°C)	Haltezeit (s)
20,0	95,0	0
20,0	45,0	40
0,2	95,0	0

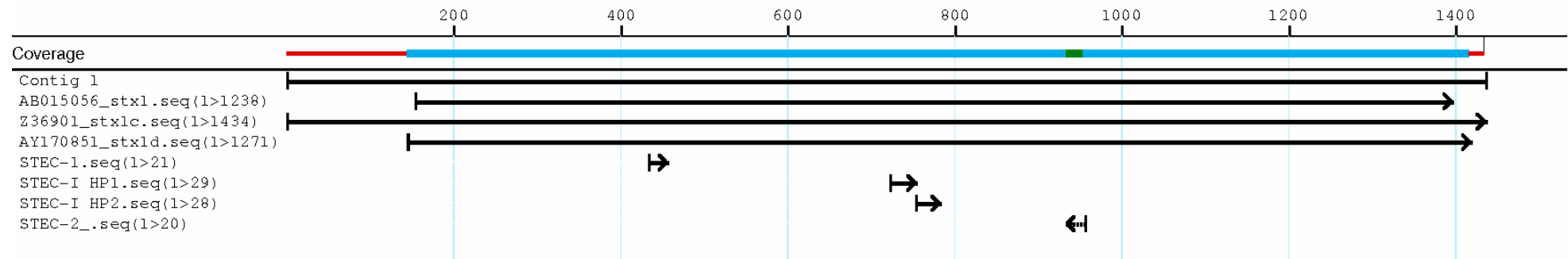
Tabelle 6: Protokoll der Schmelzkurvenanalyse

Die beiden Sondenpaare STEC-I HP1/2 und STEC-II HP1/2 erlauben die Detektion von *stx1*, *stx1c*, *stx2/2c*, *stx2d* und *stx2e* (Reischl et al., 2002) sowie *stx1d* (Kuczius et al., 2004; Mayrshofer, 2005). Die Differenzierung von *stx2* und *stx2c* ist aufgrund der identischen Schmelzkurven in einem Untersuchungsgang nicht möglich.

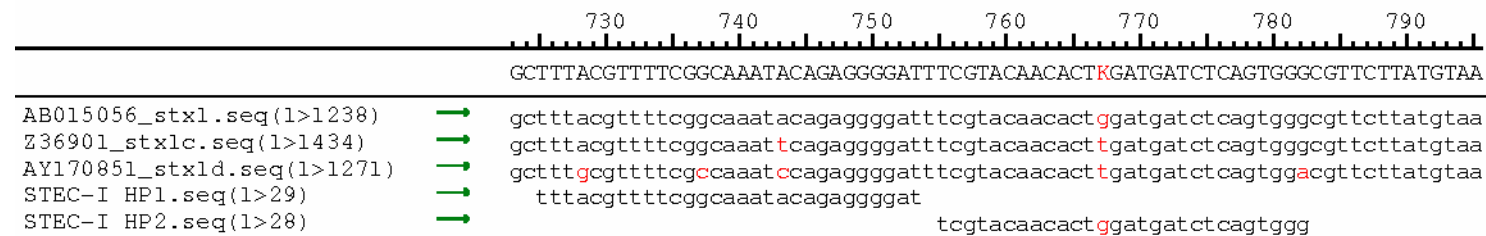
Name	Accession-Nr.	Sequenz
STEC-I HP1	AB015056	TTT ACg TTT TCg gCA AAT ACA gAg GGG AT-[FL]
STEC-I HP2	AB015056	[Red 640]-TCg TAC AAC ACT ggA TgA TCT CAg Tgg g-[Ph]
STEC-II HP1	Z37725	TCA ggC ACT gTC TgA AAC TgC TCC TgT gTA-[FL]
STEC-II HP2	Z37725	[Red 705]-ACC Atg ACg CCg ggA gAC gTg gAC CT-[Ph]

Tabelle 7: Hybridisierungssonden

Die Lage der Primer und Sonden wird in Grafik 7 für die Shigatoxingruppe 1 bildlich dargestellt. Die Hybridisierungsbereiche der Sonden für die Referenzstämme *stx1*, *stx1c* und *stx1d* werden in Grafik 8 dargestellt. Für die Shigatoxingruppe 2 zeigt Grafik 9 die Lage der Primer und Sonden in der Übersicht. Die Hybridisierungsbereiche der Sonden werden für die Referenzstämme *stx2*, *stx2c*, *stx2d* und *stx2e* in Grafik 10 aufgezeigt.

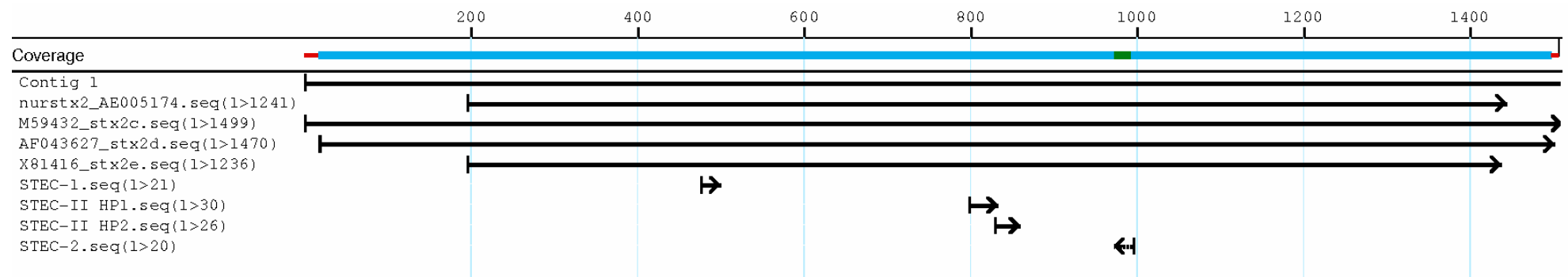


Grafik 7: Lage der Primer und Sonden (siehe Pfeile) für Shigatoxingruppe 1

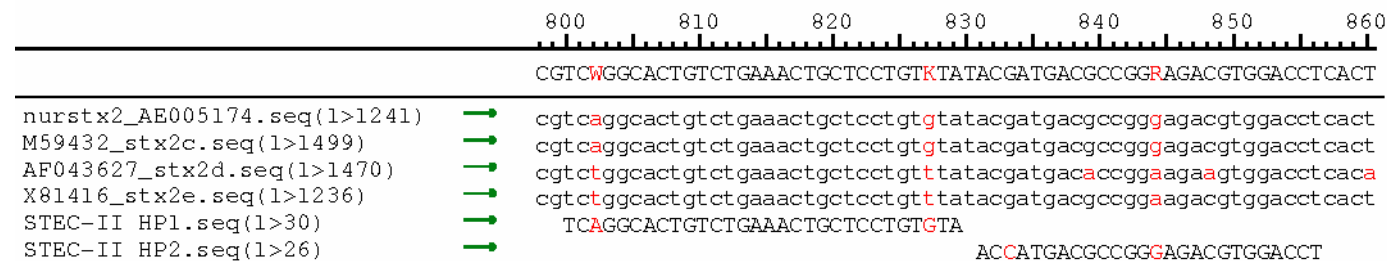


Grafik 8: Hybridierungsbereiche der Sonden STEC-I HP1 und STEC-I HP2 für Shigatoxingruppe 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*)

Die Sequenz der Sonden STEC-I HP1 und STEC-I HP2 ist homolog zur Gensequenz des Referenzstamms *stx1*, zur Sequenz des Referenzstamms *stx1c* existieren zwei unterschiedliche Nukleotide bei Position 743 bp und 767 bp (Grafik 8). Zum Referenzstamm *stx1d* lassen sich bei Position 728, 737, 743, 767 und 782 bp Unterschiede in der Nukleotidsequenz nachweisen (Grafik 8).



Grafik 9: Lage der Primer und Sonden (siehe Pfeile) für Shigatoxingruppe 2



Grafik 10: Hybridisierungsbereiche der Sonden STEC-II HP1 und STEC-II HP2 in Shigatoxingruppe 2 (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*)

Grafik 10 zeigt im Hybridisierungsbereich der Sonden zur Sequenz der Referenzstämme *stx2* und *stx2c* jeweils ein unterschiedliches Nukleotid auf Position 833 bp. Zum Referenzstamm *stx2d* existieren sechs Nukleotidunterschiede auf Position 802, 827, 833, 839, 844 und 848 bp. Die Gensequenz der Referenz *stx2e* unterscheidet sich auf Position 802, 827, 833 und 844 bp von der Sondensequenz STEC-II HP1 und STEC-II HP2.

3.3.3 Konventionelle PCR

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse und für die Sequenzierung wurden mit den Primerpaaren LP43/44, BIF/BIR, GK3/4, VT2cm/f, KS7/8, VT1AvarF/R, stx1c-1/2 und Lin-up/1_{OX3} konventionelle PCR-Untersuchungen durchgeführt. Verwendet wurden folgende Thermocycler: Blockcycler Primus 96plus (Fa. MWG, D), Mastercycler (Fa. Eppendorf, D) und Blockcycler Gene Amp PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer, USA). Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 19 gelistet, die PCR-Protokolle finden sich in Tabelle 20.

Für die Primer LP43/44, BIF/BIR, FK1/2, GK3/4, VT2cm/F und KS7/8 wurden 15 µl des, wie in Punkt 3.3.1 beschrieben, hergestellten DNA-Extraktes zu 35 µl des Mastermixes pipettiert, welcher sich, wie in Tabelle 8 bis 13 dargestellt, zusammensetzte:

Komponente	Konzentration	Menge (µl/Ansatz)	Endkonzentration (50-µl-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	24,8	---
Pufferlösung (10x) inkl. MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer LP43	10 µM	2,0	0,4 µM
Primer LP44	10 µM	2,0	0,4 µM
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/µl	0,2	0,02 IU/µl

Tabelle 8: Mastermix für PCR mit Primerpaar LP43/44

Komponente	Konzentration	Menge (µl/Ansatz)	Endkonzentration (50-µl-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	23,6	---
Pufferlösung (10x) inkl. MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	2,0	0,4 mM je dNTP
Primer BIF	10 µM	2,0	0,4 µM
Primer BIR	10 µM	2,0	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/µl	0,4	0,04 IU/µl

Tabelle 9: Mastermix für PCR mit Primerpaar BIF/BIR

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	27,3	---
Pufferlösung (10x) mit MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer FK1	10 μ M	0,8	0,16 μ M
Primer FK2	10 μ M	0,7	0,14 μ M
<i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,2	0,02 IU/ μ l

Tabelle 10: Mastermix für PCR mit Primerpaar FK1/2

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	25,6	---
Pufferlösung (10x) inkl. MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer GK3	10 μ M	1,5	0,3 μ M
Primer GK4	10 μ M	1,5	0,3 μ M
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,4	0,04 IU/ μ l

Tabelle 11: Mastermix für PCR mit Primerpaar GK3/4

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	24,8	---
Pufferlösung (10x) inkl. MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer VT2cm	10 μ M	2,0	0,4 μ M
Primer VT2f	10 μ M	2,0	0,4 μ M
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,2	0,02 IU/ μ l

Tabelle 12: Mastermix für PCR mit Primerpaar VT2cm/VT2f

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	24,8	---
Pufferlösung (10x) inkl. MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer KS7	10 μ M	2,0	0,4 μ M
Primer KS8	10 μ M	2,0	0,4 μ M
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,2	0,02 IU/ μ l

Tabelle 13: Mastermix für PCR mit Primerpaar KS7/8

Für die konventionelle PCR mit den Primern VT1AvarF/R, stx1c-1/2 sowie Lin-up/1_{OX3} wurde ein 50 μ l Ansatz hergestellt, bestehend aus 2 μ l DNA-Extrakt und 48 μ l Mastermix (siehe Tabelle 14, 15, 16):

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	31,75	---
Pufferlösung	10x	5,0	1x
MgCl	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer VT1AvarF	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Primer VT1AvarR	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,25	0,025 IU/ μ l

Tabelle 14: Mastermix für PCR mit Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	31,75	---
Pufferlösung	10x	5,0	1x
MgCl	25 mM	5,0	2,5 mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM je dNTP
Primer stx1c-1	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Primer stx1c-2	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Ampli <i>Taq</i> -Polymerase	5 IU/ μ l	0,25	0,025 IU/ μ l

Tabelle 15: Mastermix für PCR mit Primerpaar stx1c-1/2

Komponente	Konzentration	Menge (μ l/Ansatz)	Endkonzentration (50-μ l-Ansatz)
H ₂ O für PCR-Zwecke	---	31,5	---
Pufferlösung	10x	5,0	1x
MgCl ₂	25 mM	5,0	2,5mM
dNTP-Mix	10 mM je dNTP	1,0	0,2 mM
Primer Lin-up	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Primer 1 _{OX3}	10 μ M	2,5	0,5 μ M
Ampli Taq -Polymerase	5 IU/ μ l	0,5	0,05 IU/ μ l

Tabelle 16: Mastermix für PCR mit Primerpaar Lin-up /1_{OX3}

Im Anschluss an die konventionelle PCR wurden die Amplikons durch Agarosegelelektrophorese (2%iges Gel) in einer mit 1xTBE-Puffer beschickten Elektrophoresekammer (40 min bei 100 Volt, 40 mA) aufgetrennt und die Banden mit einer anschließenden 20 minütigen Ethidumbromidfärbung (0,05 %) am UV-Transilluminator (Fa. Bio-RAD, D) mit integrierter Kamera sichtbar gemacht und mittels PC ausgewertet. Als Längenstandard wurde der Molekulargewichtsmarker pUC8 (Fa. Fermentas) verwendet.

3.4 Sequenzanalyse

3.4.1 PCR-Reaktion und Aufreinigung des PCR-Produkts

Zur Sequenzierung der Shigatoxingene fanden drei Primersysteme Verwendung: STEC-1 und STEC-2, LP43 und LP44 sowie die für diese Arbeit hergestellten Primer BIF und BIR (Sequenzen der Primer siehe Tabelle 19, PCR-Protokolle siehe Tabelle 20, Mastermix-Protokolle siehe Tabellen 5, 8, 9). Die Auswahl der Primer BIF/BIR erfolgte mit der Software DNASTAR Lasergene der Fa. GATC Biotech, D.

Die Aufreinigung der zur Sequenzierung eingesetzten PCR-Produkte erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des "QIAquick PCR Purification Kit" (Fa. Qiagen, D), aufbauend auf dem Prinzip der Anionenaustauschersäulen. Hierbei adsorbierte die DNA unter Hochsalz-Bedingungen durch Zugabe eines Puffers an eine mit Silikamembran ausgestattete Zentrifugationssäule. Vorhandene Verunreinigungen wurden durch Zugabe eines zweiten Puffers ausgewaschen und die DNA anschließend unter Niedrigsalz-Bedingungen mit Hilfe eines dritten Puffers eluiert. Zwischen den einzelnen Schritten folgte jeweils ein

Zentrifugationsschritt. Die Überprüfung des Aufreinigungsprozesses erfolgte durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese. Hierfür wurden 8 µl aufgereinigtes PCR-Produkt zu 2 µl Bromphenolblaupuffer in eine Mikrotiterplatte pipettiert und daraus je untersuchter Probe 10 µl in eine Geltasche eines 2%igen Agarosegels pipettiert. Als Längenstandard wurden 10 µl pUC8 (Fa. Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese (40 min bei 100 Volt, 40 mA) erfolgte in einer mit 1xTBE-Puffer befüllten Elektrophoresekammer (Fa. Bio-Rad, D). Das Gel wurde nach 20 min Ethidiumbromidfärbung (0,05 %) in einer UV-Lichtkammer mit integrierter Kamera (Fa. Bio-RAD, D) und angeschlossenem PC ausgewertet.

3.4.2 Sequenzierreaktion

Der Ansatz für die Sequenzierreaktion erfolgte jeweils für Forward- und Reverse-Primer getrennt. Hierfür wurden 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (5 - 10 ng DNA/µl) zu 18 µl Master-Mix pipettiert, welcher sich, wie in Tabelle 17 dargestellt, zusammensetzte:

Komponente	Menge (µl/Ansatz)
Forward-Primer bzw. Reverse-Primer	2,0
5fach-Pufferlösung (BigDye® Terminator)	2,0
ReadyReactionMix (BigDye® Terminator)	4,0
HPLC-grade H ₂ O	10,0

Tabelle 17: Ansatz für Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktionen erfolgten im Blockcycler Primus 96plus (Fa. MWG Biotech, D), Protokoll siehe Tabelle 18.

Primerpaar	initiale Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		Zyklen
	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit	
STEC-1/2	96,0	1 min	96,0	10 s	50,0	5 s	60,0	4 min	30
LP 43/44	96,0	1 min	96,0	10 s	53,0	5 s	60,0	4 min	30
BIF/BIR	96,0	1 min	96,0	10 s	50,0	5 s	60,0	4 min	30

Tabelle 18: Protokoll Sequenzierreaktionen

Die Sequenzierprodukte wurden mittels Ethanol-EDTA-Natrium-Acetat gereinigt, dafür wurden die Sequenzierprodukte durch Natrium-Acetat und den Alkohol gefällt und durch Zentrifugieren am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Zu 20 µl Sequenzierprodukt wurden 2 µl EDTA (125 mM), 2 µl Natrium-Acetat (3 M) sowie 50 µl Ethanol (96 %) gegeben, gemischt und das Produkt dann in einer Kühlzentrifuge (Fa. Eppendorf, D) bei 4 °C und 3000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Template mit 60 µl 70 %igem Ethanol überschichtet und 15 min bei 1650 g und 4 °C zentrifugiert, um Salze zu entfernen. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet für eine Stunde bei 50 °C getrocknet (Sterilisator Fa. Memmert, D).

Das Auftrennen der DNA erfolgte über das automatische Kapillarsequenziergerät ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Fa. Applied Biosystems, D). Die DNA wurde dafür in 20 µl HPLC-grade H₂O resuspendiert, anschließend wurden 6 µl der gelösten DNA mit 10 µl HPLC-grade H₂O in ein Sequenziergefäß pipettiert und verschlossen. Die Kapillarelektrophorese wurde mit Hilfe der elektrokinetischen Injektion durchgeführt (Spannung 12,2 kV, Temperatur 50 °C, Zeit 120 min). Hierfür tauchten Kapillare und Elektrode gleichzeitig in das zu untersuchende Probenmaterial ein. Nach Anlegen der Spannung bewegten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente elektrophoretisch in der Glaskapillare zur Anode hin und wurden dann über ein Detektionsfenster mittels Laser zum Fluoreszieren angeregt und über eine CCD-Kamera erfasst. Die Signalverarbeitung erfolgte über die ABI Prism® Collection Software und führte zu einem vierfarbigen Elektropherogramm. Die Farbe der Peaks der Rohdaten wurde den einzelnen Nukleotiden zugeordnet und so die Gensequenz dargestellt.

3.5 Auswertung der Sequenzierergebnisse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der "Data Collection Software" (Fa. Applied Biosystems, D) sowie mit der Software DNASTAR Lasergene (Fa. GATC Biotech, D). Eine Überprüfung der sequenzierten Isolate erfolgte über die Gendatenbank PubMed mit dem Programm des "National Centre for Biotechnology Information" (NCBI) BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Primer	DNA-Sequenz	Produkt (bp)	Literatur	Hersteller
STEC-1 STEC-2	5'-GA(Ag)C(Ag)A AAT AAT TTA TAT GTG-3' 5'-TGA TgA Tg(Ag) CAA TTC AGT AT-3'	520	Reischl et al., 2002	Fa. Metabion, D
LP43 LP44	5'-ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G-3' 5'-GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C-3'	584	Cebula et al., 1995; O'Brien und La Veck, 1983b	Fa. MWG, D
BIF BIR	5'-ATC ACA TAC CGC CAT TAG-3' 5'-GTT ACC CAC ATA CCA CGA A-3'	1537	diese Arbeit	Fa. TIB MOLBIOL, D
FK1 FK2	5'-ATG AAG AAG ATG TTT ATG-3' 5'-TCA GTC ATT ATT AAA CTG-3'	280	Franke et al., 1995b	Fa. MWG, D
GK3 GK4	5'-ATG AAG AAG ATG TTT ATG-3' 5'-TCA GTC ATT ATT AAA CTG-3'	260	Karch et al., 1997	Fa. TIB MOLBIOL, D
Lin-up 1 _{ox3}	5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3' 5'-CTC ATT AGG TAC AAT TCT-3'	555	Koch et al., 2001	Fa. MWG, D
VT1AvarF VT1AVarR	5'-CTT TTC AGT TAA TGC GAT TGC T-3' 5'-AAC CCC ATG ATA TCG ACT GC-3'	192	Bürk et al., 2003	Fa. MWG, D
VT2-cm VT2-f	5'-AAA AAG ATA TTT GTA GCG G-3' 5'-TAA ACT GCA CTT CAG CAA AT-3'	256	Pierard et al., 1998	Fa. MWG, D
KS7 KS8	5'-CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC-3' 5'-CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'	282	Schmidt et al., 1994	Fa. MWG, D
stx1c-1 stx1c-2	5'-TTT TCA CAT GTT ACC TTT CCT-3' 5'-CAT AGA AGG AAA CTC ATT AGG-3'	498	Zhang et al., 2002	Fa. MWG, D

Tabelle 19: Verwendete Primer

Primerpaar	Initiale Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		Finale Elongation		Zyklen
	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit	°C	Zeit	
STEC-1/2	95,0	10 min	95,0	10 s	50,0	20 s	72,0	30 s	---	---	50
LP43/44	94,0	5 min	94,0	30 s	57,0	1 min	72,0	1 min	72,0	10 min	30
BIF/BIR	95,0	15 min	95,0	30 s	53,0	45 s	72,0	3 min	72,0	4 min	40
FK1/2	94,0	5 min	94,0	30 s	45,0	50 s	72,0	30 s	72,0	5 min	30
GK3/4	95,0	2 min	94,0	30 s	52,0	1 min	72,0	40 s	72,0	7 min	30
Lin-up/1 _{ox3}	---	---	94,0	1 min	48,1	90 s	72,0	90 s	72,0	5 min	30
VT1AvarF/R	---	---	94,0	1 min	62,0	1 min	72,0	1 min	---	---	5
			94,0	1 min	58,0	1 min	72,0	1 min			5
			94,0	1 min	54,0	1 min	72,0	1 min			20
VT2cm/f	94,0	5 min	94,0	30 s	55,0	1 min	72,0	40 s	72,0	10 min	30
KS7/8	94,0	5 min	94,0	30 s	57,0	1 min	72,0	1 min	72,0	10 min	30
stx1c-1/2	94,0	5 min	94,0	30 s	57,0	1 min	72,0	1 min	72,0	10 min	30

Tabelle 20: PCR-Protokolle

4. Ergebnisse

4.1 Überblick

Insgesamt wurden 349 STEC-Isolate aus den Jahren 1998 bis 2005 untersucht. Davon stammten 157 Isolate aus tierischen Fäzes (überwiegend von Haus- und Wildwiederkäuern), 166 aus Wasser, verteilt auf 109 Isolate aus Oberflächenwasser, 57 Isolate aus Trinkwasser und 21 Isolate aus Lebensmitteln (1 x Zwiebelmettwurst, 1 x Schweinebauch, 5 x Salametti, 1 x Cervelatwurst, 8 x Rohmilch, 1 x Molke, 1 x Hackfleisch vom Kalb, 2 x Kalbfleisch, 1 x Musaka). Aus humanen Stuhlproben stammten fünf STEC-Isolate der Jahre 2003 und 2004. Die Wasserisolate waren aus den Jahren 1998 bis 2005, die Fäzesisolate wurden im Zeitraum 1999 bis 2005 gewonnen, die Lebensmittelisolate stammten aus dem Zeitraum 2003 bis 2005.

Von 349 STEC-Isolaten konnten 307 Isolate den mituntersuchten Referenz-Shigatoxintypen zugeordnet werden (siehe Tabelle 31 im Anhang), 15 Isolate hatten ihre Shigatoxingene verloren und konnten deswegen nicht weiter typisiert werden. Eine von den Referenzstämmen differierende Schmelzkurve zeigten 27 STEC-Isolate (10 Fäzes-, 1 Lebensmittel-, 1 Trinkwasser-, 10 Oberflächenwasserisolate und 5 Isolate aus humanem Stuhl), 23 davon wurden sequenziert (siehe Tabelle 30).

Die Ergebnisse der Feintypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse wurden mit der konventionellen PCR auszugsweise überprüft, abweichende Ergebnissen wurden teilweise mittels DNA-Sequenzierung weitergehend untersucht.

4.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR

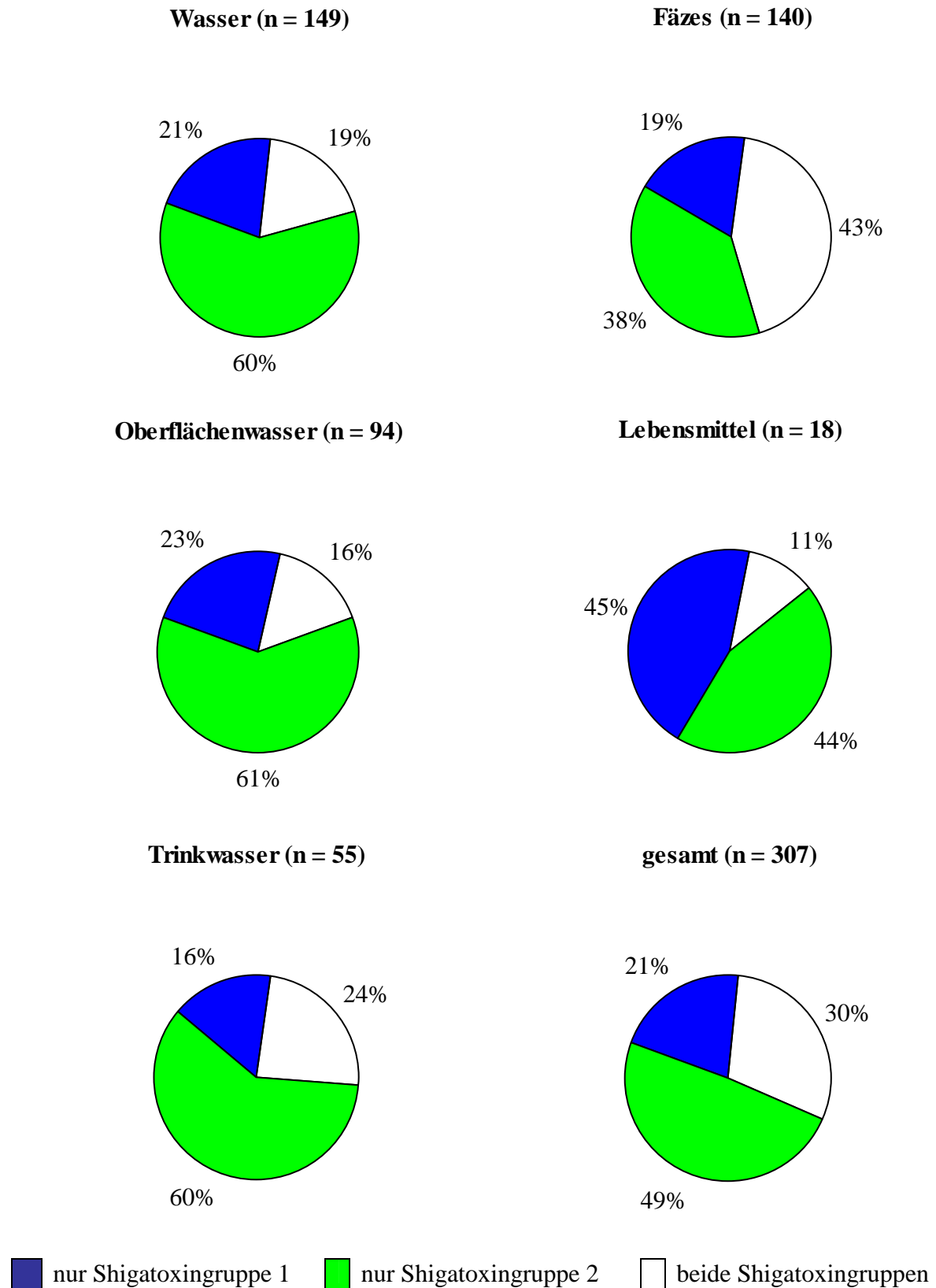
Mit der Untersuchungsmethode Real-Time-PCR wurden die Shigatoxingene der Shigatoxingruppen 1 und 2 nachgewiesen:

Insgesamt betrachtet enthielten 49 % der STEC-Isolate ausschließlich Shigatoxingene der Toxingruppe 2 (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*), 30 % der Isolate wiesen beide Toxingruppen auf und 21 % nur Toxingruppe 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*) (siehe Grafik 11).

Bei den Lebensmitteln ergab sich eine annähernd gleiche Häufigkeitsverteilung für den Nachweis der Toxingruppe 1 mit 45 % und Toxingruppe 2 mit 44 %, lediglich 11 % der STEC-Isolate enthielten beide Shigatoxingruppen (siehe Grafik 11).

Die STEC-Isolate aus tierischen Fäzes zeigten ein anderes Bild. Hier stellte die Kombination Shigatoxingruppe 1 und 2 den größten Anteil mit 43 %, 38 % enthielten nur Toxingruppe 2 und 19 % nur Toxingruppe 1 (siehe Grafik 11).

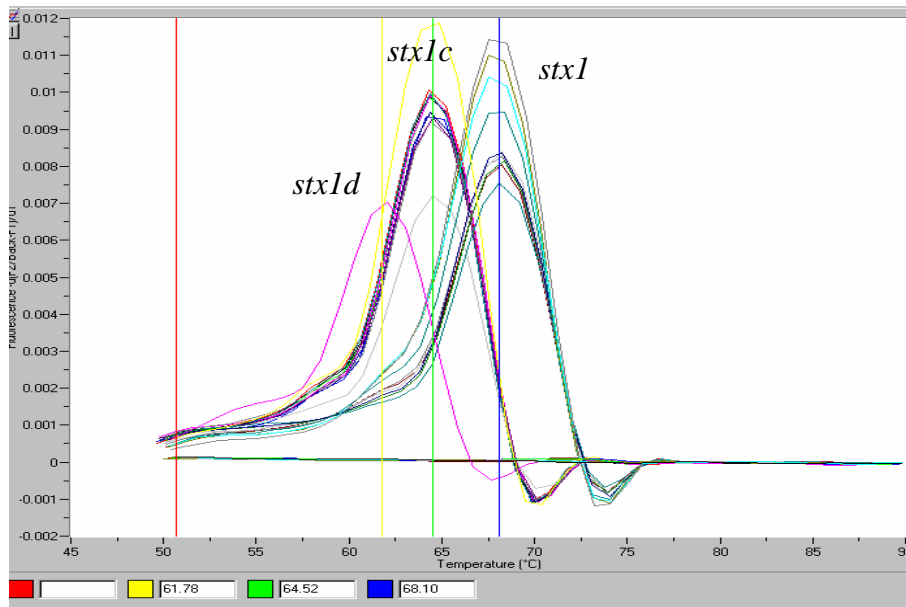
Eine einander ähnliche Verteilung zeigten die STEC-Isolate aus Wasser unabhängig davon, ob Oberflächen- oder Trinkwasser. Beide Male hatte die alleinige Shigatoxingruppe 2 einen Anteil von ca. 60 % (Wasser gesamt 60 %, Oberflächenwasser 61 %, Trinkwasser 60 %). Die anderen beiden Toxingruppen verteilten sich auf den verbleibenden Anteil gleichmäßig, wobei beim Oberflächenwasser die Shigatoxingruppe 1 mit 23 % überwog und beim Trinkwasser die Kombination Toxingruppe 1 und 2 mit 24 %, die Shigatoxingruppe 1 alleine konnte hier in 16 % der STEC-Isolate nachgewiesen werden. Eine Übersicht dazu wird in Grafik 11 dargestellt.



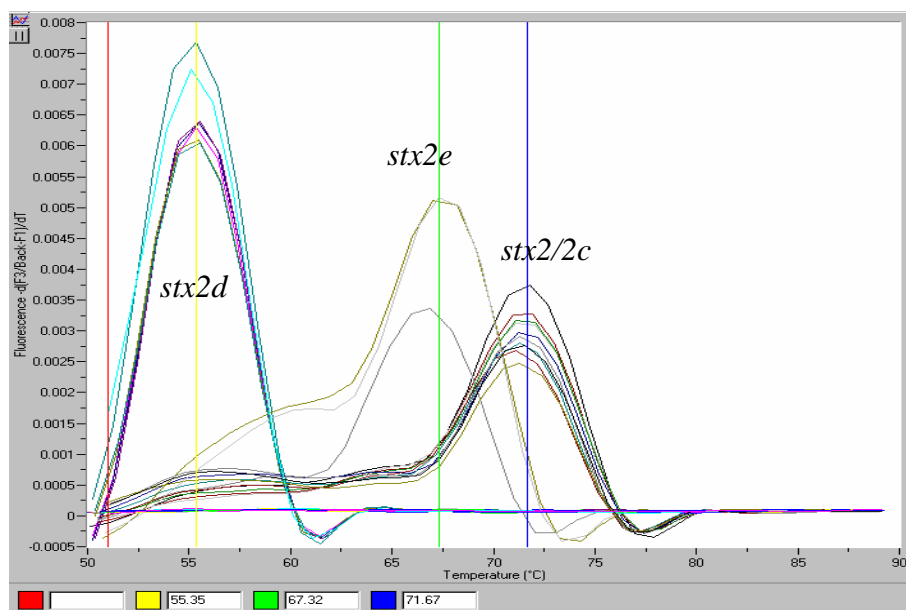
Grafik 11: Verteilung der Shigatoxingruppen 1 und 2 in den Untersuchungsmatrizes

4.3 Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse

Die beiden Grafiken 12 und 13 zeigen die Schmelzkurvenanalyse am Lightcycler® für die Shigatoxintypen der Toxingruppen 1 und 2. Die Schmelztemperatur lässt sich durch ein durch das Maximum der Kurve gefälltes Lot auf der Temperaturskala der X-Achse ablesen.



Grafik 12: Feintypisierung der STEC-Isolate: Shigatoxingruppe 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*)



Grafik 13: Feintypisierung der STEC-Isolate: Shigatoxingruppe 2 (*stx2/2c*, *stx2d*, *stx2e*)

4.3.1 Schmelztemperaturen der Shigatoxintypen

Tabelle 21 zeigt die in der Schmelzkurvenanalyse ermittelten Schmelztemperaturen der als Referenzstämme verwendeten Shigatoxintypen in der vorliegenden Arbeit und die Anzahl der jeweiligen Fehlpaarungen im Hybridisierungsbereich der Sonden STEC-I HP1/2 und STEC-II HP1/2. Die Sequenzvergleiche dazu sind in Grafik 8 für die Shigatoxingruppe 1 und in Grafik 10 für Shigatoxingruppe 2 im Kapitel Material und Methoden dargestellt.

Shigatoxin- typ	Sonden STEC-I HP1/2				Sonden STEC-II HP1/2		
	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Schmelz- temperatur [°C]	68,1 ± 2,0	64,8 ± 1,8	62,1 ± 1,8	71,4 ± 1,8	71,4 ± 1,8	55,5 ± 1,4	67,7 ± 1,9
Fehl- paarungen A-T (n)	0	1	2	0	0	1	1
Fehl- paarungen G-C (n)	0	1	3	1	1	5	3

Tabelle 21: Schmelztemperaturen der Referenzstämme mit Anzahl der Fehlpaarungen im Hybridisierungsbereich der Sonden

4.3.2 Nachweis der Shigatoxintypen einzeln und in Kombination

Am häufigsten wurde der Shigatoxintyp *stx1* **alleine** in STEC-Isolaten aus Lebensmitteln detektiert (38,9 %), in 17 % der Isolate aus Oberflächenwasser und in 14,5 % der Isolate aus Trinkwasser. Bezogen auf Wasser gesamt wurde *stx1* in 16,1 % der STEC-Isolate gefunden. In Fäzes konnte *stx1* alleine in 10 % der STEC-Isolate nachgewiesen werden, bezogen auf die gesamten Untersuchungsmatrizes in 14,7 % (siehe Tabelle 22).

Mit 9,3 % wurde der Shigatoxintyp *stx1c* **alleine** am häufigsten in STEC-Isolaten aus Fäzes nachgewiesen, in Lebensmitteln kam der Shigatoxintyp in 5,6 % und im Oberflächenwasser in 4,3 % der Isolate vor. In Trinkwasser konnte *stx1c* alleine nicht nachgewiesen werden, die Detektionsrate für Wasser gesamt beträgt aufgrund dessen 2,7 %. In der Gesamtbetrachtung trat *stx1c* in 5,9 % der untersuchten STEC-Isolate auf (siehe Tabelle 22).

Der Shigatoxintyp *stx1d* **alleine** wurde in 2,1 % der STEC-Isolate aus Oberflächenwasser und in 1,8 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser nachgewiesen. Für die Betrachtung Wasser gesamt ergab sich ein Anteil von 2 %. Weder in Lebensmitteln noch in Fäzes konnte *stx1d* detektiert werden. Insgesamt konnte *stx1d* alleine in 1 % der Isolate dokumentiert werden (siehe Tabelle 22).

Eine Zuordnung der Isolate mit Shigatoxintyp *stx2* und/oder *stx2c* zu den einzelnen Shigatoxintypen war anhand der Schmelztemperatur mit den Sonden STEC-II HP1/2 in einem PCR-Untersuchungsgang nicht möglich, da beide eine identische Schmelztemperatur haben. In dieser Studie kann daher nur von dem Detektieren von *stx2/2c* gesprochen werden, nicht selektiv von *stx2* oder *stx2c*. Am häufigsten konnte *stx2/2c* **alleine** mit 25,5 % in STEC-Isolaten aus Trinkwasser detektiert werden, gefolgt von Oberflächenwasser mit 18,1 %. Daraus ergab sich für Wasser gesamt eine Nachweishäufigkeit von 20,8 %. Innerhalb der STEC-Isolate aus Fäzes erwiesen sich 25 % *stx2/2c* positiv und aus Lebensmitteln 22,2 % der STEC-Isolate. Die Betrachtung aller Untersuchungsmatrizes ergab eine Nachweisrate von 22,8 % für *stx2/2c* (siehe Tabelle 22).

Der Shigatoxintyp *stx2d* **alleine** wurde mit 6,4 % am häufigsten in den STEC-Isolaten aus Oberflächenwasser nachgewiesen. In 3,6 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser trat *stx2d* singulär auf, bezogen auf Wasser gesamt ergab sich eine Nachweisrate von 5,4 %. Bei den STEC-Isolaten aus Fäzes konnte in 3,6 % der Fälle *stx2d* detektiert werden, jedoch in keinem Isolat aus Lebensmitteln. Innerhalb der gesamten Untersuchungsmatrizes ergab sich eine Nachweisrate von 4,2 % (siehe Tabelle 22).

In 30,9 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser fand sich der Shigatoxintyp *stx2e* **alleine** sowie in 36,2 % der STEC-Isolate aus Oberflächenwasser. Bei der Betrachtung von Wasser gesamt wurde *stx2e* alleine in 34,2 % der Fälle nachgewiesen. Im Bereich Lebensmittel waren 22,2 % der STEC-Isolate *stx2e* positiv, bei den Fäzes 7,9 %. In der Gesamtbetrachtung ergab sich eine Nachweisrate von 21,5 % (siehe Grafik 31 im Anhang und Tabelle 22).

Die **Kombination** *stx1* + *stx2/2c* wurde in 18,2 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser und in 9,6 % der Isolate aus Oberflächenwasser detektiert. Für Wasser gesamt ergab sich eine Nachweisrate von 12,8 %. In den STEC-Isolaten aus Fäzes stellte sich diese Kombination in 13,6 % dar, kein einziges Mal jedoch in Lebensmitteln. Insgesamt wurden *stx1* + *stx2/2c* in 12,4 % der Isolate detektiert (siehe Tabelle 22).

Nur in Lebensmitteln (5,6 %) und in Fäzes (0,7 %) wurde *stx1* in **Kombination** mit *stx2d* nachgewiesen. Daraus ergab sich eine Detektionsrate von 0,7 %, bezogen auf die gesamten Untersuchungsmatrizes (siehe Tabelle 22).

In 1,8 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser wurde der Shigatoxintyp *stx1* **zusammen** mit *stx2e* detektiert, jedoch in keinem Isolat aus Oberflächenwasser. Die Detektionsrate für Wasser gesamt lag bei 0,7 %. In den STEC-Isolaten aus Fäzes konnte in 1,4 % *stx1* zusammen mit *stx2e* nachgewiesen werden, diese Kombination wurde in keinem Lebensmittelisolat detektiert. Bezogen auf die gesamten Untersuchungsmatrizes konnte ein Nachweis von *stx1* in Verbindung mit *stx2e* in 1 % der STEC-Isolate erbracht werden (siehe Tabelle 22).

Die Kombination Shigatoxintyp *stx1c* **mit** *stx2d* wurde in 27,9 % aller STEC-Isolate aus Fäzes nachgewiesen. Im Oberflächenwasser konnte diese Kombination in 6,4 % der Fälle dargestellt werden, im Trinkwasser in 3,6 % der STEC-Isolate. Insgesamt ergab sich für Wasser eine Detektionsrate von 5,4 %. Im Lebensmittel wurde *stx1c* mit *stx2d* in 5,6 % der Fälle nachgewiesen. Für die Gesamtbetrachtung aller Untersuchungsmatrizes ergab sich eine Häufigkeit von 15,6 % (siehe Tabelle 22).

In einem STEC-Isolat aus tierischen Fäzes (0,7 %) konnte die **Kombination** *stx2/2c* + *stx2d* nachgewiesen werden. Damit wurde diese Kombination in 0,3 % aller Untersuchungsmatrizes detektiert (siehe Tabelle 22).

Matrix	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx1</i> + <i>stx2/2c</i>	<i>stx1</i> + <i>stx2d</i>	<i>stx1</i> + <i>stx2e</i>	<i>stx1c</i> + <i>stx2d</i>	<i>stx2/2c</i> + <i>stx2d</i>
Wasser gesamt (n = 149)	16,1	2,7	2,0	5,4	34,2	20,8	12,8	0,0	0,7	5,4	0,0
Trinkwasser (n = 55)	14,5	0,0	1,8	3,6	30,9	25,5	18,2	0,0	1,8	3,6	0,0
Oberflächenwasser (n = 94)	17,0	4,3	2,1	6,4	36,2	18,1	9,6	0,0	0,0	6,4	0,0
Fäzes (n = 140)	10,0	9,3	0,0	3,6	7,9	25,0	13,6	0,7	1,4	27,9	0,7
Lebensmittel (n = 18)	38,9	5,6	0,0	0,0	22,2	22,2	0,0	5,6	0,0	5,6	0,0
gesamt (n = 307)	14,7	5,9	1,0	4,2	21,5	22,8	12,4	0,7	1,0	15,6	0,3

Tabelle 22: Durch Schmelzkurvenanalyse ermittelte Häufigkeit der Shigatoxintypen und deren Kombinationen (alle Angaben in %)

4.3.3 Verteilung der Shigatoxintypen in verschiedenen Matrices

Betrachtet man die Feintypisierung der STEC-Isolate mittels Schmelzkurvenanalyse unabhängig von der Herkunft der Isolate, so ist *stx2/2c* mit 109 Nachweisen in 307 Isolaten (109/307) der am häufigsten auftretende Shigatoxintyp. Am zweithäufigsten wurde *stx1* in 88 von 307 Isolaten detektiert, *stx2e* (69/307), *stx1c* (66/307) und *stx2d* (64/307) sind ähnlich häufig vertreten. Selten gefunden wurde der Shigatoxintyp *stx1d* (3/307). Die Ergebnisse werden in nachfolgender Tabelle 23 zusammengefasst.

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	88	66	3	109	64	69

Tabelle 23: Verteilung der Shigatoxintypen ermittelt mit Schmelzkurvenanalyse (n = 307)

Wie aus Tabelle 24 ersichtlich ist, lässt sich durch die Schmelzkurvenanalyse bei den Lebensmittelisolaten am häufigsten *stx1* in 8 von 18 Isolaten nachweisen, gefolgt von *stx2/2c* (4/18) und dem ebenso oft nachgewiesenen Shigatoxintyp *stx2e* (4/18). Der Shigatoxintyp *stx1d* trat nicht auf, in zwei von 18 Isolaten konnten *stx1c* und *stx1d* detektiert werden.

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	8	2	0	4	2	4

Tabelle 24: Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Lebensmitteln ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse (n = 18)

Tabelle 25 zeigt, dass in der Untersuchung der STEC-Isolate aus tierischen Fäzes *stx2/2c* mit 55 Nachweisen in 140 Isolaten am häufigsten detektiert wurden, gefolgt von den Shigatoxintypen *stx1c* (52/140) und *stx2d* (46/140). In 36 von 140 STEC-Isolaten konnte der Toxintyp *stx1* nachgewiesen werden, am seltensten der Shigatoxintyp *stx2e* (13/140).

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	36	52	0	55	46	13

Tabelle 25: Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Fäzes ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse (n = 140)

Die Betrachtung der STEC-Isolate aus Wasser (Trink- und Oberflächenwasser) zeigt *stx2e* als am häufigsten detektierten Shigatoxintyp (52/149). Ähnlich häufig konnte *stx2/2c* mit 50 von 149 STEC-Isolaten nachgewiesen werden. An dritter Stelle stand *stx1* (44/149). Der Shigatoxintyp *stx2d* trat in 16 von 149 Isolaten auf, *stx1c* in zwölf von 149. Der Shigatoxintyp *stx1d* konnte lediglich in drei von 149 STEC-Isolaten belegt werden, siehe dazu Tabelle 26

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	44	12	3	50	16	52

Tabelle 26: Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Wasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse (n = 149)

Im Oberflächenwasser wurde der Shigatoxintyp *stx2e* (34/94) am häufigsten nachgewiesen, die Kombination *stx2/2c* (26/94) und der Shigatoxintyp *stx1* (25/94) wurden annähernd gleich häufig nachgewiesen, *stx2d* (12/94), *stx1c* (10/94) und *stx1d* (2/94) kamen eher selten vor. Die Ergebnisse werden in Tabelle 27 dargestellt.

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	25	10	2	26	12	34

Tabelle 27: Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Oberflächenwasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse (n = 94)

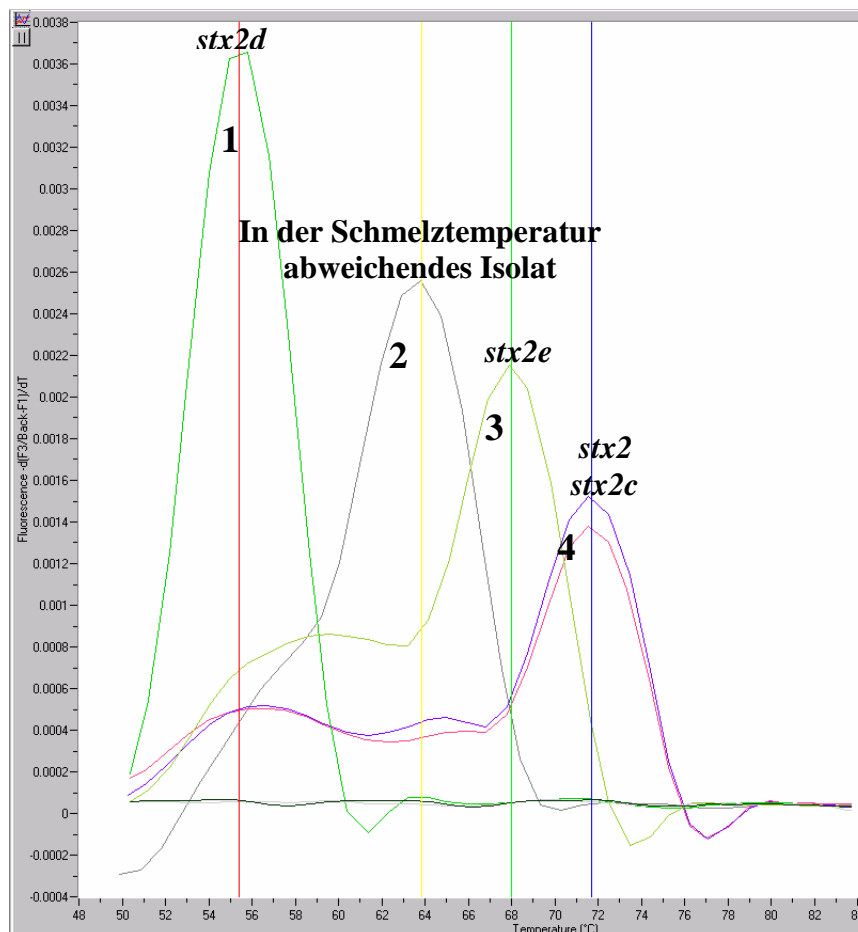
Die Feintypisierung der Shigatoxintypen im Trinkwasser, dargestellt in Tabelle 28, zeigt *stx2/2c* (24/55) am häufigsten vertreten, gefolgt von *stx1* (19/55). In 18 von 55 STEC-Isolaten wurde der Shigatoxintyp *stx2e* nachgewiesen, die Shigatoxintypen *stx2d* (4/55), *stx1c* (2/55) und *stx1d* (1/55) wurden, ähnlich wie im Oberflächenwasser, eher selten detektiert.

	<i>stx1</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
Häufigkeit (n)	19	2	1	24	4	18

Tabelle 28: Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Trinkwasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse (n = 55)

4.3.4 Abweichende Isolate

Isolate, welche sich in der Schmelzkurvenanalyse nicht den Schmelztemperaturen der Referenzstämmen zuordnen ließen, wurden in der Shigatoxingruppe 2 detektiert, jedoch nicht in der Shigatoxingruppe 1. Die Grafik 14 zeigt die Schmelzkurvenanalyse am Lightcycler® für die Shigatoxingruppe 2 mit den Referenzstämmen *stx2*, *stx2c*, *stx2d* und *stx2e* und die abweichende Schmelzkurve eines Isolats. Deutlich zu erkennen ist, dass die Schmelztemperatur des untersuchten STEC-Isolats nicht mit den Schmelztemperaturen der Referenz-Shigatoxingestämme übereinstimmt. Eine Übereinstimmung der Schmelztemperaturen würde ein Bild ähnlich den Schmelzkurven der Referenzstämmen *stx2* und *stx2c* ergeben.



Grafik 14: Schmelzkurven der Referenzstämmen (1,3, 4) und eines in der Schmelztemperatur von den Referenzstämmen abweichenden STEC-Isolats (2)

Die von den Schmelztemperaturen der Referenzen abweichenden Isolate ließen sich anschließend aufgrund der Gensequenzanalyse in 2 Gruppen einteilen: eine Gruppe mit 22

Isolaten mit einer Schmelztemperatur von $65,9\text{ °C} \pm 2$ und eine weitere, bestehend aus einem Isolat mit einer Schmelztemperatur von $63,3\text{ °C} \pm 1,3$.

Gruppe	<i>stx2/2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>
65,9 °C	$5,4 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,8$
63,3 °C	$7,8 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$

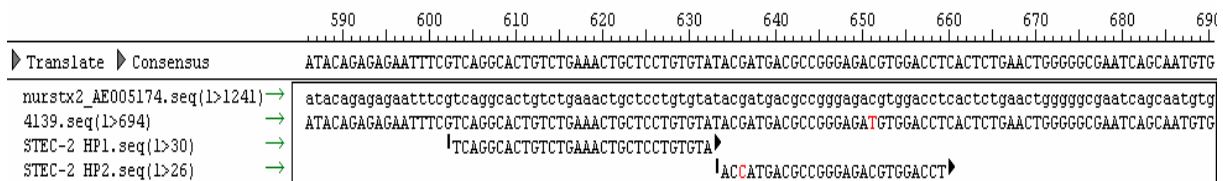
Tabelle 29: Temperaturdifferenzen der abweichenden Isolate zu den Referenzstämmen
[° C]

Die Tabelle 29 zeigt die Schmelztemperaturdifferenzen zwischen den in der Schmelztemperatur abweichenden STEC-Isolaten und den Referenzstämmen. Diese Temperaturdifferenzen schwankten dabei in der Gruppe 65,9 °C um $\pm 0,6\text{ °C}$ zu den Referenzstämmen *stx2* und *stx2c* bis $\pm 0,8\text{ °C}$ zur Schmelztemperatur des Referenzstamms *stx2e*. Die Temperaturunterschiede der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C zu den Referenzstämmen bewegten sich im Bereich von $\pm 0,1\text{ °C}$ zur Schmelztemperatur der Referenzstämme *stx2* und *stx2c* bis $\pm 0,3\text{ °C}$ zur Schmelztemperatur des Referenzstamms *stx2e*.

4.4 Ergebnisse der Sequenzierung

Die Gruppe mit der Schmelztemperatur 65,9 °C (siehe Tabelle 29) wies mit drei Sequenzunterschieden auf einer Länge von 680 bp eine hohe Homologie zur Gensequenz des Referenzstamms *stx2* (99,6 % auf 680 bp, siehe Grafik 19 im Anhang) auf. Die Homologien zu den anderen Referenzstämmen betrugen 99,4 % zur Gensequenz von *stx2c* (siehe Grafik 20 im Anhang), 95,7 % zur Gensequenz von *stx2d* (siehe Grafik 21 im Anhang) und 93,7 % zur Referenzsequenz *stx2e* (siehe Grafik 22 im Anhang) sowie 95,3 % zu *stx2g* (32 Basenunterschiede auf einer Länge von 680 bp).

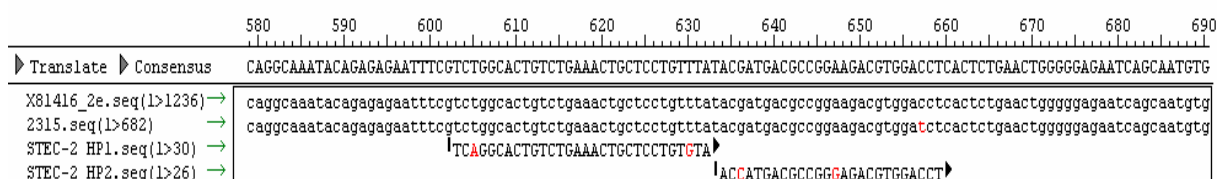
Im Hybridisierungsbereich der Sonden wiesen diese Isolate zwei Fehlpaarungen bei den G-C-Bindungen auf. Im Vergleich zum Sondenhybridisierungsbereich des Referenzstamms *stx2* zeigte sich für diese Gruppe ein unterschiedliches Basenpaar (Position 651 in Grafik 15).



Grafik 15: Hybridisierungsbereich der Sonden für *stx2* und die Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus der Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C im Vergleich

Die Gruppe mit Schmelztemperatur 63,3 °C (siehe Tabelle 29) wies mit zwei Sequenzunterschieden auf einer Länge von 682 bp die höchste Homologie zur Gensequenz des Referenzstamms *stx2e* (99,7 %, siehe Grafik 26 im Anhang) auf. Die Homologien zu den anderen Referenzstämmen betrugen 93,8 % mit 42 Sequenzunterschieden auf einer Länge von 682 bp zur Gensequenz von *stx2* (siehe Grafik 23 im Anhang), 94,1 % zur Gensequenz des Referenzstamms *stx2c* (siehe Grafik 24 im Anhang) und 93,8 % zum Referenzstamm *stx2d* (siehe Grafik 25 im Anhang), sowie 94,7 % zur Gensequenz *stx2g* (36 Basenunterschiede auf einer Länge von 682 bp).

Verglichen mit der Gensequenz des *stx2e*-Referenzstamms zeigte sich im Hybridisierungsbereich der Sonden ebenfalls ein unterschiedliches Basenpaar (Position 657 in Grafik 16). Damit wies die Gensequenz im Hybridisierungsbereich der Sonden eine Fehlpaarung bei den A-T-Bindungen auf und zwei Fehlpaarungen bei den G-C-Bindungen.



Grafik 16: Hybridisierungsbereich der Sonden für *stx2e* und die Gensequenz des STEC-Isolats 2315 aus der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C

Bei der Überprüfung in der NCBI Gensequenzdatenbank ließen sich beide Gruppen (Gruppe mit Schmelztemperatur 65,9 °C und Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C) zwei bereits in der Literatur beschriebenen Shigatoxinvarianten zuordnen:

Die Gruppe 65,9 °C, welche eine hohe Homologie zur Gensequenz des Referenzstamms *stx2* zeigte, ließ sich mit 100 % Übereinstimmung auf einer Länge von 1135 bp einer von De Baets

et al. (2004) beschriebenen Shigatoxinvariante, Stamm ECB-217, mit der Accession-Nummer AY443054 zuordnen (siehe Grafik 27 im Anhang). In einer mit *stx2/2c*-spezifischen Primern (GK3/GK4) durchgeführten konventionellen PCR waren die STEC-Isolate aus dieser Gruppe positiv.

Die zweite Gruppe (63,3 °C), mit einer hohen Homologie zur Gensequenz des Standards *stx2e*, ließ sich ebenfalls mit 100 % Übereinstimmung auf einer Länge von 682 bp einem von Reischl et al. (2002) beschriebenen Stamm 3615-99 mit der Accession-Nummer AJ313016 zuordnen (siehe Grafik 28 im Anhang). Auch hier zeigte eine mit *stx2e*-spezifischen Primern (FK1/2) durchgeführte konventionelle PCR ein positives Ergebnis.

Schmelztemperaturgruppe (°C)	Isolat	Matrix	Serotyp
65,9	L 193-1 <i>stx2</i>	LM	O22:HNT
65,9	WA 1013/01	OW	ONT:H18
65,9	WA 4139/99	OW	O113:H4
65,9	WA 5320/00	OW	O6:H10
65,9	WA 5857/00	OW	O22:HNT
65,9	WA (TW) 5860/00	OW	O113:H31
65,9	WA 7030/99	OW	O91:H14
65,9	WA 8947/01 <i>stx1+2</i>	OW	O113:H4
65,9	WA 16077	OW	O116:H21
65,9	12126	Stuhl	OX181:H8
65,9	14546	Stuhl	O113:H4
65,9	14765	Stuhl	O113:H21
65,9	14767	Stuhl	O113:H21
65,9	WA (TW) 9660/00 <i>stx2</i>	TW	O113:H4
65,9	180a 84-19	Fäzes	O22:H8
65,9	180a 84-16	Fäzes	O22:H8
65,9	180a 84-15	Fäzes	ONT:H2
65,9	180a 84-12 <i>stx2</i>	Fäzes	ONT:HNT
65,9	180a 99-19	Fäzes	O113:H17
65,9	180-12	Fäzes	O116:H21
65,9	180a 180-7	Fäzes	O22:H21
65,9	173a 1877-22	Fäzes	O22:H8
63,3	WA 2315/00	OW	ONT:H10

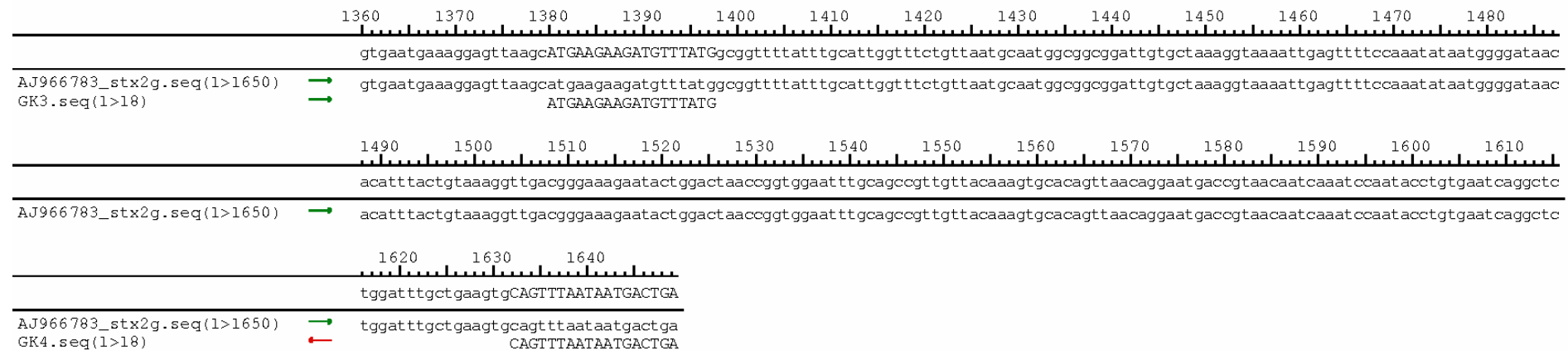
Tabelle 30: Sequenzierte Isolate (LM = Lebensmittel, OW = Oberflächenwasser, TW = Trinkwasser)

4.5 Ergebnisse der konventionellen PCR und weiterführender Untersuchungen

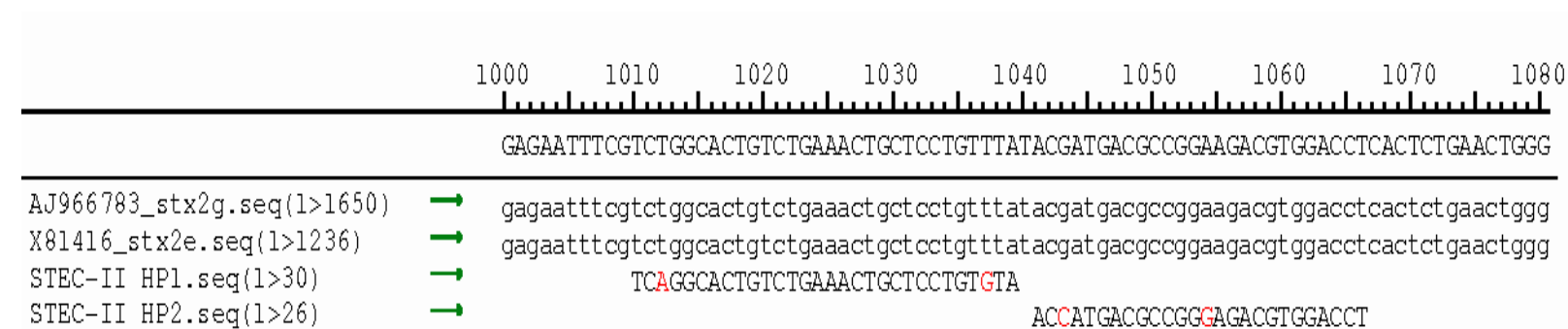
Die Ergebnisse der in der Schmelzkurvenanalyse als *stx1*, *stx1c*, *stx1d* sowie als *stx2/2c* und *stx2d* identifizierten Shigatoxingene ließen sich in der Überprüfung durch die konventionelle PCR mit den Primern KS7/8 (Shigatoxingruppe 1), Lin-up/1_{ox3} (*stx1c*), *stx1c*-1/2 (*stx1c*), VT1AvarF/R (*stx1d*), LP43/44 (Shigatoxingruppe 2), GK3/4 (*stx2/2c*), VT2cm/f (*stx2d*) bestätigen.

Von den 69 in der Schmelzkurvenanalyse als *stx2e* identifizierten Isolaten wurden 31 in der konventionellen PCR mit den für *stx2e*-spezifischen Primern FK1/2 als Shigatoxintyp *stx2e* bestätigt, 32 konnten nicht als *stx2e* bestätigt werden. Davon entfielen 15 Isolate auf Trinkwasser [WA (TW) 14850, 12168/01, 13169, 1948/99, 7410/00, 8619/00, 13716, 13878/00, 14580, 15662, 16262/99, 10874/00, 13714, 13880/00 STX2, 8066/99)], acht Isolate auf Oberflächenwasser (WA 10012/99, 10645/00, 11148/00, 11659/99, 12238/00, 15158-98, 4141-99, 4202-99) und zehn auf tierische Fäzes (180a 124II Pos. 28, 180a 191-2, 180a 191-3, 180a 191-30, 180a 191-7, 180a 99-1, 180a 99-18, 180a 99-5, 180a 99-9, 180a 101-8). Sechs Isolate hatten ihre Shigatoxingene verloren bzw. konnten nicht überprüft werden.

Eine Untersuchung der mit den Primern FK1/2 nicht als *stx2e* bestätigten Isolate ergab ein positives Ergebnis in der konventionellen PCR mit dem für *stx2/2c*-spezifischen Primerpaar GK3/4. Von diesen Isolaten wurden beispielhaft drei Isolate [WA 10645, WA 11148, WA (TW) 10874] zur Aufklärung sequenziert. Die Sequenzierung erbrachte folgendes Ergebnis: Die Gensequenz der Isolate zeigte bei der Überprüfung mit der Gendatenbank PubMed NCBI BLAST eine 99,6 bzw. 99,8 %ige Übereinstimmung auf einer Strecke von 497 Basenpaaren mit der Gensequenz des Shigatoxinstamms *stx2g* (Accession-Nr. AJ966783). Der Vergleich des Shigatoxinstamms *stx2g* mit den Primern GK3/4 ergab eine Konformität von 100 %. Anschaulich wird dies durch Grafik 17 dargestellt. Grafik 18 zeigt die Übereinstimmung im Bereich der Sonden STEC-II HP1 und STEC-II HP2 für die beiden Shigatoxintypen *stx2e* und *stx2g*.



Grafik 17: Bindung der Primer GK3/4 am Referenzstamm *stx2g*



Grafik 18: Sequenzvergleich *stx2g* und *stx2e* im Hybridisierungsbereich der Sonden STEC-II HP1/2

Für die Überprüfung des Schmelzkurvenergebnisses *stxI* wurden 19 Isolate mit der konventionellen PCR bestätigt [WA (TW) 9979/99, WA (TW) 9980/99, WA (TW) 5374/00, WA (TW) 13880/00, WA 17019, WA 5040, WA 7947/00, 180a 669K, 180as 3378-1, 180a 66E, 180a 36S1/01, 180a 191-17 STX1,2; 180a 190-42, 180a 190-38 STX1,2; 180a 190-20, 180a 190-29, 180az 798-25, 180a 36-S1/01], ein Isolat konnte aufgrund des Verlusts des Shigatoxingens nicht bestätigt werden (WA 3205-99).

Das Schmelzkurvenergebnis *stxIc* wurde für 23 Isolate bestätigt [WA 8872/01, WA 8949/01, WA 7696/00, WA 2198/01, WA (TW) 5113, WA (TW) 5114, WA 4711, WA 4628, 180az 5491/1, 180az 5491/4, 180a 88-1, 180a 106 I/4, 180a 106 I/5, 180a 106 I/7, 180a 106 I/8, 180a 138/4, 180a 138/5, 180a 106 I/7, 180a 106 I/8, 180a 138/4, 180a 138/5, 180a 138/7, 180a 138/8], ein Isolat konnte aufgrund des Verlusts des Shigatoxingens nicht bestätigt werden (180az 5491/3).

Für den Shigatoxintyp *stxId* wurden drei von drei untersuchten Isolaten bestätigt [WA 4908/98, WA 13183/98, WA (TW) 8523/99].

Bei der Überprüfung der Schmelzkurvenergebnisse *stx2/2c* konnte für folgende Isolate das Ergebnis bestätigt werden: WA (TW) 9979-99, WA (TW) 9980-99, WA 7947/00, WA 5040, WA (TW) 5374/00, WA 3205-99, WA 1609, 180az 669K, 180az 3378-1, 180a 66E, 180a 36-S1/01, 180a 190-38 STX2, 180a 190-42, 180a 190-20, 180a 190-29, 180a 180-5, 180az 798-25. Ein Isolat konnte aufgrund des Verlustes des Shigatoxingens nicht bestätigt werden (WA 17019).

Der Shigatoxintyp *stx2d* konnte bei allen 20 untersuchten Isolaten (WA 8872-01, WA 8949/01, WA 7696/00, WA 2198/01, WA (TW) 5113, WA (TW) 5114, WA 4711, WA 4628, 180az 5491/1, 180az 5491/3, 180az 5491/4, 180a 88-1, 180a 106 I/4, 180a 106 I/5, 180a 106 I/7, 180a 106 I/8, 180a 138/4, 180a 138/5, 180a 138/7, 180a 138/8) bestätigt werden.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit der Real-Time-PCR und der Schmelzkurvenanalyse eine Übersicht über die Verteilung einzelner Shigatoxintypen in verschiedenen Matrices, wie Oberflächenwasser, Trinkwasser, tierische Fäzes und Lebensmitteln zu erstellen und damit gegebenenfalls Hinweise auf spezifische Gefährdungspotenziale abzuleiten. Die STEC-Isolate wurden ebenso wie alle Kontrollstämme aus der Stammsammlung des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zur Verfügung gestellt. Auffällige STEC-Isolate, welche sich in der Schmelzkurvenanalyse keinem Referenz-Shigatoxintyp zuordnen ließen, wurden exemplarisch sequenziert. Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden mit der konventionellen PCR überprüft, abweichende Isolate exemplarisch mittels Sequenzanalyse weitergehend untersucht.

5.1 Methoden und Ergebnisse

5.1.1 Methodenbetrachtung Real-Time-PCR

Die zur Detektion der Shigatoxingruppen 1 und 2 verwendete Untersuchungsmethode Real-Time-PCR mit dem Lightcycler[®] weist im Vergleich mit der konventionellen PCR eine höhere Sensitivität und auch eine höhere Spezifität auf. Dabei lagen die Nachweisgrenzen in der Real-Time-PCR für die Shigatoxingruppen 1 und 2 bei 3,2 bzw. einer DNA-Kopie und damit deutlich unter der Nachweisgrenze der konventionellen PCR mit 80 DNA-Kopien (Busch et al., 2007c; Lang et al., 2005). Weitere Vorteile der Real-Time-PCR liegen in der verkürzten Untersuchungsdauer, dem Wegfallen der post-PCR-Arbeitsschritte mit den damit verbundenen Gefahren der Kontamination und dem Erübrigen des Anfärbens der Amplifikate mit der mutagenen Substanz Ethidiumbromid (Busch, 2007b; Busch et al., 2007c).

5.1.2 Methodenbetrachtung Schmelzkurvenanalyse

Die Methodik der Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler[®] ermöglichte in einem Untersuchungsgang die Zuordnung zu den einzelnen Shigatoxintypen anhand der Schmelztemperaturen der Kontrollstämme. Verwendet wurden Kontrollstämme der Shigatoxintypen *stx1*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d* und *stx2e*. Die von Reischl et al. (2002) entwickelten Sonden STEC-I HP1, STEC-I HP2, STEC-II HP1 und STEC-II HP2 erlaubten die Detektion und Differenzierung der verschiedenen Shigatoxintypen *stx1*, *stx1c*, *stx1d* sowie

stx2d innerhalb eines Untersuchungsgangs. Ermöglicht wurde dies durch die Lage der Sonden in einer hypervariablen Region. Eine Differenzierung zwischen den Shigatoxintypen *stx2* und *stx2c* in einem Untersuchungsgang war aufgrund identischer Schmelztemperaturen mit der Schmelzkurvenanalytik nicht möglich, sodass in dieser Arbeit von der Detektion von *stx2/2c* berichtet wird.

Die Überprüfung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse für den Shigatoxintyp *stx2e* mit der konventionellen PCR zeigte Probleme der Schmelzkurvenanalyse auf. Die Sequenzanalyse von drei der 32 nicht bestätigten *stx2e*-Isolate wies im anschließenden Gendatenbankvergleich eine 99,6 bzw. 99,8 %ige Übereinstimmung mit dem durch Leung et al. (2003) beschriebenen Shigatoxintyp *stx2g* auf. Damit ließ sich zeigen, dass der Shigatoxintyp *stx2g* eine zu *stx2e* identische Schmelztemperatur hat. Erklären lässt sich dies dadurch, dass die Gensequenz des Shigatoxintyps *stx2e* im Hybridisierungsbereich der Sonden STEC-II HP1 und STEC-II HP2 identisch zur Gensequenz des Shigatoxintyps *stx2g* ist. So werden aufgrund der alleinigen Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse *stx2g*-positive Proben als *stx2e* interpretiert. Zur Abklärung dieser Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse ist zusätzlich eine konventionelle PCR mit typspezifischen Primern notwendig.

Bei der Untersuchung mittels konventioneller PCR stellte sich zudem heraus, dass *stx2g*-positive Proben bei der *stx2/2c*-Untersuchung mit den Primern GK3/4 ebenfalls positiv nachgewiesen werden. Damit war der Shigatoxintyp *stx2g* in der Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden STEC-II HP1 und STEC-II HP2 mit dem Shigatoxintyp *stx2e* identisch und in der Untersuchung mittels konventioneller PCR mit den Primern GK3/4 identisch mit den Shigatoxintypen *stx2* und *stx2c*. Dadurch sind Untersuchungsergebnisse zur Typisierung von Shigatoxinen, welche aufgrund der konventionellen PCR mit den Primern GK3/4 für *stx2/2c* erzielt wurden, ohne weitere Verifizierung - wie beispielsweise der Schmelzkurvenanalyse - ebenfalls nicht eindeutig.

Die Bestimmung des Shigatoxintyps anhand der Schmelztemperatur ist nur in direktem Vergleich mit dem Referenzstamm möglich, dies zeigen auch die teilweise differierenden Schmelztemperaturangaben anderer Autoren wie Kuczius et al. (2004), Mayrshofer (2005) und Reischl et al. (2002). So wurde in dieser Arbeit für den Shigatoxintyp *stx1c* eine Schmelztemperatur von $64,8\text{ °C} \pm 1,8\text{ °C}$ ermittelt. Die Angaben in der Literatur dazu liegen bei 63 °C (Mayrshofer, 2005), 65 °C (Reischl et al., 2002) und $65\text{ °C} - 66\text{ °C}$ (Kuczius et al.,

2004). Ähnlich unterschiedlich liegen die Angaben in der Literatur zu Shigatoxintyp *stx1d*: Mayrshofer (2005) detektierte eine Schmelztemperatur von 61 °C und Kuczius et al. (2004) 64 °C. Die in dieser Arbeit ermittelte Schmelztemperatur für den Shigatoxintyp *stx1d* betrug 62,1 °C ± 1,8 °C. Eine Beeinflussung der Schmelztemperatur ist zum Beispiel durch die Salzkonzentration wie etwa Magnesiumdichlorid im Reaktionsansatz möglich. Eine höhere Konzentration an MgCl₂ führt dabei zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur. Ebenso ist eine Beeinflussung der Interaktionen der Hybridisierungs sonden untereinander bzw. mit den Zielgensequenzen durch geringfügige Änderungen im Reaktionsansatz denkbar (Reischl et al., 2002).

5.1.3 Verlust des Shigatoxingens

Von den mit der Real-Time-PCR untersuchten 349 STEC-Isolaten aus der Stammsammlung des LGL hatten 15 Isolate ihre Shigatoxingene verloren. Der Verlust der toxingentragenden Phagen bei *Escherichia coli* ist ein bekanntes Phänomen. So berichteten bereits Karch et al. 1992 von toxinproduzierenden *E. coli*, welche nach Subkultivierung keine Toxingene mehr aufwiesen. Dieses Phänomen trat sowohl bei Subkultivierung auf flüssigen als auch auf festen Nährmedien auf. Auswirkungen hat dieser Befund vor allem auf den molekularbiologischen Nachweis einer Infektion. Es besteht die Möglichkeit, dass ein STEC nicht als EHEC identifiziert wird, sondern als EPEC. Dies kann sich nachteilig auf die Behandlung des Patienten auswirken, da ein früher Nachweis von EHEC eng mit einer guten nephrologischen Prognose verbunden ist (Tarr et al., 2005). EHEC-Bakterien, welche die Fähigkeit verloren haben, Shigatoxin zu exprimieren (EHEC-LST), wurden in einer Studie von Bielaszewska et al. (2007) in 5,5 % der untersuchten 787 HUS-Patienten nachgewiesen. Demgegenüber standen 55 % der 787 HUS-Patienten mit EHEC-Nachweis. Auf der Grundlage dieser Daten kommt auf zehn HUS-Patienten mit positivem EHEC-Nachweis, basierend auf dem Nachweis der Shigatoxinproduktion bzw. des Shigatoxingens, ein HUS-Patient mit EHEC-LST.

5.1.4 Detektion von Toxinvarianten

Über die Detektion von Polymorphismen bzw. Gensequenzvariationen innerhalb der Shigatoxingene durch die Schmelzkurvenanalyse wurde von Reischl et al. (2002) im Zusammenhang mit der Typisierung berichtet. Die von Kuczius et al. (2004) dabei beschriebene größere Heterogenität der Shigatoxingruppe 2 im Vergleich zur Shigatoxingruppe 1 wird auch in der vorliegenden Arbeit durch das Auftreten von

Schmelztemperaturdifferenzen bei 27 Isolaten innerhalb der Shigatoxingruppe 2 bestätigt. Die DNA-Sequenzierung von 23 der Shigatoxingene der Isolate dieser Arbeit, welche in der Schmelztemperatur von den untersuchten Referenzstämmen abwichen, führte zu zwei nachfolgend beschriebenen Varianten von Shigatoxinbildenden *E. coli*.

Eine Gruppe von 22 STEC-Isolaten mit ähnlichen Schmelztemperaturen wies in der Sequenzanalyse eine hohe Ähnlichkeit zur Gensequenz des Referenzstamms *stx2* auf. Die Ergebnisse der exemplarischen Sequenzierung der Shigatoxingene dieser Isolate zeigten sich nach Überprüfung in der PubMed NCBI Gendatenbank homolog zu einer von De Baets et al. (2004) veröffentlichten Variante mit der Bezeichnung EBC-217 aus einem humanen STEC-Isolat. In den STEC-Isolaten dieser Studie ließ sich diese Variante sowohl aus Stuhl als auch aus Trinkwasser, Oberflächenwasser, Lebensmitteln und tierischen Fäzes nachweisen. Diese Ergebnisse weisen auf eine weite Verbreitung in der Umwelt hin. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, da *stx2* zu den am häufigsten mit HUS assoziierten Shigatoxintypen zählt.

Die zweite Gruppe, bestehend aus einem Isolat mit Schmelztemperatur $63,3\text{ °C} \pm 1,3\text{ °C}$, wies in der Sequenzanalyse die höchste Übereinstimmung mit dem Shigatoxintyp *stx2e* auf. Die Recherche in der PubMed NCBI Gendatenbank zeigte, dass dieses Isolat homolog zu einer von Reischl et al. (2002) detektierten Variante 3615-99 ist. Die ermittelte Schmelztemperatur stimmt mit der von Reischl et al. (2002) erhaltenen überein. Diese Variante wurde in der vorliegenden Studie erstmals in einem Isolat aus Oberflächenwasser nachgewiesen, die erste Isolierung von Reischl et al. (2002) erfolgte aus der Matrix Stuhl. Über weiterführende Untersuchungen zu diesem Stamm wurde bisher nicht berichtet.

Die Untersuchung der beiden detektierten Varianten mit *stx2*- bzw. *stx2e*-spezifischen Primern in der konventionellen PCR ergab keine Abweichungen zu den untersuchten Kontrollstämmen. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte damit, dass sie das Potenzial besitzt, über die Routinediagnostik hinaus auch neue Varianten zu detektieren, welche durch die Untersuchungsmethode konventionelle PCR nicht als Variante erfasst werden.

5.1.5 Ergebnisbetrachtung bezogen auf Shigatoxintyp und Matrices

Über das Vorkommen der Variante *stx1d* wurde bisher nur in bovinen Fäzes (Bürk et al., 2003; Mayrshofer et al., 2005; Ohmura-Hoshino et al., 2003), Meeresfrüchten (Gourmelon et al., 2006) und humanem Stuhl (Kuczius et al., 2004) berichtet. In der vorliegenden Arbeit

konnte *stx1d* sowohl in 2 % der STEC-Isolate aus Trinkwasser als auch in 2,1 % der Isolate aus Oberflächenwasser nachgewiesen werden. Der Nachweis im Trinkwasser lässt auf eine fäkale Verunreinigung schließen. Epidemiologische Daten liegen von Mayrshofer (2005) vor. Der Autor konnte den Shigatoxintyp *stx1d* in 12,9 % der bovinen STEC-Isolate nachweisen, dabei in 2,4 % in Kombination mit einem weiteren Shigatoxintyp (*stx1* bzw. *stx1c*). In dieser Studie wurde *stx1d* als alleiniges Shigatoxingen nachgewiesen.

In Bayern werden Oberflächengewässerproben mit einem Gehalt von mehr als 200 KBE *E. coli*/100 ml seit 1998 auf STEC untersucht. Dabei konnten in 1,2 bis 3,5 % der in den Jahren 1998 bis 2000 auf STEC untersuchten Verdachtsproben *stx*-Gene nachgewiesen werden. Betrachtet man die Gesamtzahl der von Schindler et al. (2003) untersuchten Proben - entnommen auch aus Seen und Flüssen, die zum Baden benutzt werden - so waren 0,1 bis 2,9 % STEC-positiv. Beim Vergleich der Verteilung der Isolate aus Oberflächengewässern und tierischen Fäzes zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Matrices. Die 140 STEC-Isolate aus tierischen Fäzes der vorliegenden Studie enthielten zu annähernd gleichen Teilen Toxingene der Shigatoxingruppe 2 (38 %) und die Shigatoxingruppen 1 und 2 kombiniert (43 %). Ein direkter Eintrag aus tierischen Fäkalien würde eine ähnliche Verteilung im Oberflächenwasser erwarten lassen. In den 94 STEC-Isolaten aus Oberflächenwasser überwiegt jedoch der Anteil der Shigatoxingruppe 2 mit 61 % und ist damit um mehr als 20 % höher als in den STEC-Isolaten aus tierischen Fäzes. Die beiden Shigatoxingruppen in Kombination wurden im Oberflächenwasser lediglich in 16 % der STEC-Isolate (Fäzes 43 %) nachgewiesen.

Für diese differierende Verteilung gibt es folgende mögliche Erklärungen. Zum einen könnte durch den Eintrag von *stx*-transduzierenden Phagen über Exkrementen anderer, nicht in dieser Studie erfasster Tierarten eine Verschiebung stattfinden. Eine andere Ursache für diese Differenz könnte ein selektiver und im Vergleich mit der Shigatoxingruppe 2 erhöhter Verlust des *stx*-Gens der Shigatoxingruppe 1 bei *E. coli* mit ursprünglich zwei Shigatoxingenen im Umgebungsmedium Wasser sein. Wahrscheinlicher wäre jedoch ein Eintrag über humane Fäzes durch Kläranlagen, da 56 % der STEC-Bakterien in Kläranlagen nicht eliminiert werden und eine von Roldgaard et al. (2004) durchgeführte Studie zur Häufigkeit von *stx2* in VTEC-O157-Isolaten aus humanen Stuhlproben eine *stx2*-Nachweisrate von 55 % zeigte.

Im Bereich Lebensmittel unterscheiden sich die im Rahmen dieser Studie vorgelegten Ergebnisse zur Verteilung der Shigatoxingruppen von den Ergebnissen von Bülte (2001).

Zurückzuführen ist diese Differenz möglicherweise auf die voneinander abweichende Anzahl der untersuchten Proben. Bülte (2001) fand bei 46,6 % der untersuchten 459 STEC-Isolate die Kombination der Shigatoxingruppen 1 und 2, während lediglich 11,8 % ausschließlich die Shigatoxingruppe 1 enthielten. In der vorliegenden Studie zeigte sich dagegen bei den untersuchten 18 STEC-Isolaten eine annähernd gleiche Verteilung der Shigatoxingruppe 1 (45 %) und der Shigatoxingruppe 2 (44 %). Den geringsten Anteil (11 %) machte die Gruppe der STEC-Isolate aus, bei welcher eine Kombination aus den Shigatoxingruppen 1 und 2 detektiert wurde. Neben der abweichenden Anzahl könnte eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Arbeiten auch in einer abweichenden Zusammensetzung der Lebensmittelproben liegen.

5.1.6 Ergebnisbetrachtung hinsichtlich der Virulenz

Aufgrund ihrer Virulenz lassen sich die verschiedenen Shigatoxintypen in zwei Gruppen einteilen: Eine, die mit HUS und Diarrhö assoziiert ist (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d_{activatable}* allein oder in Kombination) und eine zweite, mit Diarrhö und asymptomatischem Ausscheidertum assoziierte Gruppe (*stx1c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx1* + *stx2d*, *stx1c* + *stx2d*, *stx2g*, *stx2f*), welche jedoch bisher nicht im Zusammenhang mit HUS beschrieben wurde (Bielaszewska et al., 2006; Boerlin et al., 1999, Friedrich et al., 2002b, 2003; Mellmann et al., 2004; Nataro und Kaper, 1998; Persson et al., 2007; Zhang et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auf der Grundlage dieser Einteilung eine spezifische Gefährdung für die Entwicklung eines schwerwiegenden Verlaufs der Erkrankung im Falle einer Infektion mit STEC über Lebensmittel und Trinkwasser. In den STEC-Isolaten aus beiden Matrices sind die mit HUS und Diarrhö assoziierten Shigatoxintypen mit einem Anteil von zwei Dritteln vertreten (Trinkwasser 58,2 % und Lebensmittel 61,1 %). Bei den STEC-Isolaten aus tierischen Fäzes lag der Anteil der mit HUS- und Diarrhö-assozierten Shigatoxintypen bei 48,6 %, ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den STEC-Isolaten aus Oberflächenwasser mit 44,7 % HUS- und Diarrhö-assozierten Shigatoxintypen.

Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen den überwiegend mit HUS assoziierten Shigatoxintyp *stx2/2c* mit einem Anteil von 36,2 % vor allem in STEC-Isolaten aus Oberflächenwasser. Er kam mit einem Anteil von durchschnittlich 27 % jedoch in allen Untersuchungsmaterialien sehr oft vor und ist auch einer der am häufigsten vertretenen Shigatoxintypen. Oberflächenwasser stellt auch aufgrund der möglichen Verwendung als

Gießwasser für pflanzliche Lebensmittel eine Gefährdungsquelle dar. Anforderungen an Wasser zum Gießen von Gemüse wurden nach einem *E.-coli*-O157-Ausbruch 2005 in Schweden formuliert. Hier wurde gefordert, dass Gießwasser zumindest den Anforderungen an Badewasser genügen sollte (Söderström et al., 2008).

Der gleichfalls bei Patienten mit HUS detektierte Shigatoxintyp *stxI* wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von 38,9 % überwiegend in Lebensmitteln gefunden. Die Verteilung in den STEC-Isolaten aus Wasser und Fäzes liegt bei 17 % und 10 %. Dieser Befund ist bedeutend hinsichtlich der Risikobewertung, da - im Unterschied zu Oberflächenwasser oder Fäzes - von mit STEC-kontaminierten Lebensmitteln für den Verbraucher ein hohes direktes Gefahrenpotenzial für die Entwicklung eines HUS ausgeht. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen von Strachan et al. (2006) zu den Infektionsursachen von *E. coli* O157 Infektionen in Schottland. Bezogen auf das ursächliche Agens wurden nur 46 % der Ausbrüche durch Lebensmittel verursacht, betrachtet man jedoch die Anzahl der Erkrankten wurde für 83 % der Personen Lebensmittel als Infektionsursache nachgewiesen.

Zur Reduktion des Risikos einer Infektion durch STEC-kontaminierte Lebensmittel wurden vielfach Methoden, sowohl physikalischer, chemischer als auch biologischer Art getestet. Keine der einzelnen Maßnahmen wie Hitze, Kälte, Trocknung, ionisierende Strahlung, UV-Licht, Fermentation sowie die Behandlung mit Oxidantien erwies sich als Universalrezept zur Verringerung der STEC-Kontamination der Lebensmittel (Erickson und Doyle, 2007). Aussichtsreich erscheint die Kombination mehrerer Verfahren in einem Hürdenkonzept. Dies ermöglicht die Anpassung an die jeweilige Textur des Lebensmittels, den Ausgangskeimgehalt, die Lagerbedingungen und die Verzehrsgewohnheiten der Verbraucher.

Die Kombination *stxI* + *stx2/2c*, welche ebenfalls im Zusammenhang mit HUS nachgewiesen wurde, konnte mit einem Anteil von 18,2 % am häufigsten in STEC-Isolaten aus Trinkwasser detektiert werden. STEC-Isolate aus Oberflächenwasser und Fäzes wiesen jeweils einen Anteil von 9,6 % (Oberflächenwasser) und 13,6 % (Fäzes) an dieser Kombination auf. In Lebensmitteln konnte *stxI* in Verbindung mit *stx2/2c* nicht detektiert werden.

Keine Angaben über eine Detektion im Zusammenhang mit HUS, Diarrhö bzw. symptomlosem Ausscheidertum liegen zum Shigatoxintyp *stxId* sowie zu den Kombinationen

stx1 + *stx2e* und *stx2/2c* + *stx2d* vor. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Gruppe in 2,7 % der STEC-Isolate aus Wasser nachgewiesen, davon 3,6 % bezogen auf Trinkwasser und 2,1 % auf Oberflächenwasser. Die Kombination *stx1* + *stx2e* für sich betrachtet wurde in 1 % aller STEC-Isolate detektiert, *stx2/2c* + *stx2d* in 0,3 %.

Friedrich et al. (2002b) warfen die Frage auf, ob die Shigatoxintypen *stx2d* und *stx2e* überhaupt als ätiologische Durchfallerreger in Erscheinung treten. Möglicherweise, so die Autoren, ist ein Nachweis im Zusammenhang mit diesem Symptom eher zufälliger Natur und die Diarrhö ist auf eine andere Ursache zurückzuführen. Ausschlaggebend war die Beobachtung, dass ein vergleichbarer Anteil der Shigatoxintypen *stx2d* und *stx2e* sowohl aus Stuhlproben diarrhöerkrankter Patienten als auch asymptomatischer Ausscheider detektiert werden konnte. Stephan und Hoelzle (2000) konnten in einer Schweizer Studie gar 65 % der von asymptomatischen Ausscheidern isolierten EHEC dem Shigatoxintyp *stx2d* zuordnen.

5.2 Schlussfolgerung

Die Differenzierung der Shigatoxine stellt ein wichtiges Instrument im Rahmen der EHEC/STEC-Diagnostik dar. Dem klinisch tätigen Arzt kann mit diesen Daten eine wichtige Entscheidungshilfe an die Hand gegeben werden, welche zudem von der Berechnung des Wirtschaftlichkeitsbonus des Arztes ausgenommen ist. Eine prognostische Abschätzung des möglichen Infektionsverlaufs wird erleichtert und der Patient kann bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung intensiv überwacht werden. Frühzeitig eingeleitete Maßnahmen, wie zum Beispiel eine stationäre Aufnahme und Flüssigkeitstherapie beim Nachweis von *stx1*, *stx2*, *stx2c* und *stx2d_{activatable}*, können dazu beitragen, die Entwicklung einer postinfektiösen HUS-Erkrankung zu verhindern bzw. die Prognose deutlich zu verbessern.

Eine differenzierte Herangehensweise durch die Typisierung der einzelnen Shigatoxine wäre auch bei Personen, die unter Verdacht stehen, an EHEC erkrankt zu sein oder bereits erkrankt sind sowie Ausscheider und Personen, in deren Wohngemeinschaft eine EHEC-Erkrankung oder ein Verdachtsfall aufgetreten sind, eine Hilfe. So dürfen diese Personengruppen laut § 34 Infektionsschutzgesetz (2001) Gemeinschaftseinrichtungen, in denen überwiegend Säuglinge, Kinder oder Jugendliche betreut werden, bis zum Ausschluss einer Weiterverbreitung der Krankheit nicht bzw. nur unter Beachtung von Schutzmaßnahmen betreten. Hier kann die Unterscheidung zwischen einer Infektion mit Shigatoxintypen, welche mit Diarrhö oder schwerwiegenden Verläufen assoziiert sind, und solchen, die nicht als humanpathogene

Erreger in Erscheinung treten, dem Gesundheitsamt zielgerichtete Maßnahmen ermöglichen und den Betroffenen gegebenenfalls eine frühere Teilnahme am normalen Tagesgeschäft, wie die Rückkehr in Betreuungseinrichtungen, etc. erlauben. Eine ähnliche Vorgehensweise ist auch für Personen, die in der Lebensmittelherstellung tätig sind, denkbar.

Angesichts der abgebildeten Verteilung der Shigatoxintypen im Lebensmittel mit einem 2/3-Anteil der mit HUS und Diarrhö assoziierten Shigatoxintypen wären effektive Maßnahmen zur Verringerung des Gefährdungspotenzials über Lebensmittel, z. B. über mehrstufige Hürdenkonzepte angepasst an das jeweilige Nahrungsmittel und die weiteren Verarbeitungsschritte im Haushalt ein wichtiger Schritt seitens der Lebensmittelhersteller zur Senkung des Infektionsrisikos des Verbrauchers.

6. Zusammenfassung

In das Zentrum veterinärmedizinischen Interesses rückten Shigatoxinbildende *Escherichia coli* durch das Reservoir im Tierreich und die mögliche Infektion über Lebensmittel. Besonders hervorzuheben ist der Aspekt, dass den verschiedenen Shigatoxintypen eine unterschiedliche Virulenz zugesprochen wird. Dabei werden vor allem die Shigatoxintypen *stx1*, *stx2*, *stx2c* und *stx2d_{activatable}* als Risikofaktoren für die Entwicklung von postinfektiösen Komplikationen angesehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Verteilung der Shigatoxintypen in unterschiedlichen Matrices. Hierzu wurden STEC-Isolate der Stammsammlung des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit mit der Real-Time-PCR und der Schmelzkurvenanalyse untersucht und den einzelnen Shigatoxintypen zugeordnet. STEC-Isolate, welche sich nicht den Referenz-Shigatoxintypen zuordnen ließen, wurden exemplarisch sequenziert. Insgesamt wurden 349 Isolate untersucht, bestehend aus 157 Isolaten aus tierischen Fäzes, 109 Isolaten aus Oberflächenwasser, 57 Isolaten aus Trinkwasser, 21 aus Lebensmitteln und 5 Isolaten aus humanen Stuhlproben. Von diesen Isolaten hatten 15 ihre Shigatoxingene verloren und diese konnten deswegen nicht weiter typisiert werden. Die Ergebnisse der Real-Time-PCR zeigten folgende Verteilung: 49 % der Isolate enthielten nur Shigatoxintypen der Gruppe 2 (*stx2/2c*, *stx2d*, *stx2e*), 21 % der Isolate enthielten nur Shigatoxintypen der Gruppe 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*), beide Toxingruppen waren in 30 % der Isolate enthalten. Die Betrachtung der einzelnen Matrices ergab für die STEC-Isolate aus Lebensmitteln als am häufigsten mit der Schmelzkurvenanalyse detektierten Shigatoxintyp *stx1*, in den tierischen Fäzes wurde am häufigsten *stx2/2c* detektiert, ebenso in Trinkwasser. Dagegen enthielt Oberflächenwasser überwiegend den Shigatoxintyp *stx2e*. Eine von den Referenz-Shigatoxinstämmen abweichende Schmelztemperatur wiesen 27 STEC-Isolate auf, von diesen wurden 23 sequenziert. Die sequenzierten Isolate ließen sich in zwei Gruppen einteilen, welche sich bereits in der Literatur beschriebenen Shigatoxinvarianten zuordnen ließen. Die Überprüfung der Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse mit der konventionellen PCR zeigte Differenzen in der Typisierung von Shigatoxintyp *stx2e*. Die Sequenzanalyse einzelner dieser differierenden Isolate ergab den Shigatoxintyp *stx2g*. Die Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden STEC-I HP1/2 und STEC-II HP1/2 stellt damit eine wichtige und sehr sensitive Methode dar, um zusätzlich zur Typisierung der Shigatoxingene auch neue Varianten zu detektieren, weist aber Probleme bei der Bestimmung und Abgrenzung von Shigatoxintyp *stx2e* zu *stx2g* auf.

7. Summary

Molecularbiological Finetyping of Shiga Toxingenotypes of *Escherichia coli* in Water, Feces and Food

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* became a focus for veterinarians due to their reservoirfunction in animals and possible foodbased infections. Of major interest is the different virulence proposed for the Shiga toxingenotypes. Especially the Shiga toxingenotypes *stx1*, *stx2*, *stx2c* and *stx2d_{activatable}* seem to represent risk factors for developing post-infectious complications. This study was initiated to analyze the distribution of the Shiga toxingenotypes in different matrices. The investigated isolates derived from the Bavarian Health and Food Safety Authority. Isolates were analyzed by Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction and and finally typed by melting curve analysis. Non typeable isolates, based on melting curve analysis in combination with Reference-Shiga-toxingenotypes were also sequenced for further information. A total of 349 isolates were characterized: 157 originated from animal feces, 109 from environmental water, 57 from drinking water, 21 from food, and 5 from human origin. Out of these isolates 15 had lost their Shiga toxigenes and these were therefore excluded for further analysis. Summarizing the results of Real-Time-PCR illustrates the following distribution of Shiga toxigenogroups: 49 % of the isolates showed Shiga toxingenotypes group 2 (*stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*), 21 % of the isolates showed Shiga toxingenotypes group 1 (*stx1*, *stx1c*, *stx1d*) and 30 % contained both groups of Shiga toxingenotypes. Detailed analysis of the different results of the melting curve analysis for each matrix demonstrated that Shiga toxingenotype *stx1* was the one most frequently found in food, *stx2/2c* was mostly found in animal feces and in drinking water. Environmently water contained mostly Shiga toxingenotype *stx2e*. A total of 27 isolates demonstrated a melting temperature different from the reference group. Of these isolates 23 were sequenced for further information. Sequenced isolates could be divided into two groups, both similar to variants already described in the literature. Further investigations of the results from the melting curve analysis with the Blockcycler-PCR showed differences in typing of Shiga toxingenotype *stx2e*. Sequenceanalysis of some of these isolates showed Shiga toxingenotype *stx2g*. Melting curve analysis with probes STEC-I HP1/2 and STEC-II HP1/2 represents an important and sensitive method for typing Shiga toxingenotypes as for the detection of new variants. Problems exist for the differentiation between Shiga toxingenotypes *stx2e* and *stx2g* with melting curve analysis.

8. Anhang

8.1 Anhang zu "Material und Methoden"

8.1.1 Zubehör und Verbrauchsmaterialien

- Kapillare 2–61 cm x 50 µm (Fa. Appl Biosystems, D)
- ABI Prism® Collection Software (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Sample Tubes (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Deckel (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Rack (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Gelkammer B2 12–14 cm (Fa. Bio-RAD, D)
- Kamm 20 Well (Fa. Bio-RAD, D)
- Kamm 15 Well (Fa. Bio-RAD, D)
- Kamm 10 Well (Fa. Bio-RAD, D)
- Messzylinder 100 ml (Fa. Brand Eterna, D)
- Pipette Eppendorf Reference 0,5–10 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipetten Eppendorf Reference 2–20 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipette Eppendorf Reference 10–100 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipette Eppendorf Reference 100–1000 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Eppendorf Multipette® plus (Fa. Eppendorf, D)
- Transferpipette® 5–50 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S. filter PCR clean 10 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S. filter PCR clean 100 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S. filter PCR clean 1000 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen ep T.I.P.S. filter reload 2–200 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen Eppendorf Combitips plus 10 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Pipettenspitzen Eppendorf Combitips plus 50 µl (Fa. Eppendorf, D)
- Eppendorf safe-lock-tubes 2 ml (Fa. Eppendorf, D)
- Eppendorf safelock-tubes 1,5 ml (Fa. Eppendorf, D)
- Pinzette Hauptner 86 (Fa. Hauptner, D)
- Wattetupfer (Fa. Herenz, D)
- Messzylinder 500 ml (Fa. Hirschmann, D)
- Handschuhe Safeskin Purple Nitrile powder-free (Fa. Kimberly-Clark, USA)
- Handschuhe Safeskin Satin Plus powder-free latex (Fa. Kimberly-Clark, USA)

-
- Acrylständer 96 Plätze (1,5 ml/2,0 ml) (Fa. Kisker, D)
 - Acrylständer 48 Plätze (1,5 ml/2,0 ml) (Fa. Kisker, D)
 - Reversible Rack (Fa. Kisker, D)
 - Iso Freeze PCR-Rack (Fa. Kisker, D)
 - Software DNA-Star (Fa. Lasergene, D)
 - Cryoröhrchen (Fa. Mast Diagnostica, D)
 - Cryoblock (Fa. Mast Diagnostica, D)
 - ENDO-Agarplatten (Fa. Oxoid, D)
 - MicroAmp Reaction Tubes (Fa. Perkin Elmer , USA)
 - MicroAmp Capes (Fa. Perkin Elmer, USA)
 - LightCycler® Capillaries 20 µl (Fa. Roche, D)
 - LightCycler® Sample Carousel (Fa. Roche, D)
 - Mikrotiterplatten (Fa. Sarstedt, D)

8.1.2 Chemikalien

- POP-6™ Gel (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Puffer 10% mit EDTA (Fa. Appl. Biosystems, D)
- AmpliTaq® DNA-Polymerase (Fa. Appl. Biosystems, D)
- GeneAmp® dNTPs (Fa. Appl. Biosystems, D)
- GeneAmp® 10x PCR-Puffer (Fa. Appl. Biosystems, D)
- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Molekulargewichtsmarker pUC 8 (Fa. Fermentas MBI, D)
- AmpuWa®, Wasser, DNase-frei, (Fa. Fresenius Kabi, D)
- isotonische Kochsalzlösung (Fa. Fresenius Kabi, D)
- Wasser für Injektionszwecke (50 ml) (Fa. Grünenthal, D)
- Wasser zu Injektionszwecken (2 ml) (Fa. Jenapharm, D)
- Reinstwasser, HPLC-Qualität (Fa. LGC Promochem, D)
- peqGOLD Universal Agarose (Fa. peqlab, D)
- QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, D)
- LightCycler® Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Fa. Roche, D)
- Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml (Fa. Roth, D)
- EDTA 125 mM (Fa. Roth, D)

- TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), Stammlösung 5 x TBE
 - ❖ 27,5 g Borsäure H_3BO_3 (Fa. Roth, D)
 - ❖ 3,72 g EDTA- Na_2 (Fa. Roth, D)
 - ❖ 54,0 g Tris-Base (Trizma[®] Base) (Fa. Sigma-Aldrich, D)
 - ❖ Aqua dest. ad 1000 ml
- Gebrauchslösung: 1x TBE (1 Teil Stammlösung und 4 Teile Aqua dest.)
- Natrium-Acetat 3M (Fa. Sigma-Aldrich, D)
- Ethanol absolut (Fa. Sigma-Aldrich, D)

8.1.3 Geräte

- ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer (Fa. Appl. Biosystems, D)
- Elektrophorese-Kammer SUB-CELL[®] (Fa. Bio-RAD, D)
- Stromquelle POWER PAC 300 (Fa. Bio-RAD, D)
- UV-Kammer mit integrierter Kamera Gel-Doc 1000 (Fa. Bio-RAD, D)
- Computer mit Auswertungssoftware Molecular Analyst 1.5 (Fa. Bio-RAD, D)
- Kühlschrank Bosch economic cooler (Fa. Bosch, D)
- Eppendorf Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, D)
- MasterCycler (Fa. Eppendorf, D)
- Tischzentrifuge 5417 R (Fa. Eppendorf, D)
- Tischzentrifuge Micro 7 (Fa. Fisher Scientific)
- Sterilbank Hera Safe (Fa. Heraeus GmbH, D)
- Gefrierschrank - 80 °C (Fa. Kendro, D)
- Analysenwaage KERN 474 (Fa. Kern, D)
- Sterilisator Typ S10 (Fa. Memmert, D)
- Drucker Mitsubishi Video Copy Processor PG 6 DE (Fa. Mitsubishi, Japan)
- Mikrowelle Micro-Chef FM B935 (Fa. Moulinex, D)
- Blockcycler Primus 96plus (Fa. MWG, D)
- Tischzentrifuge Costar[®] (Fa. neoLab[®], D)
- Blockcycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer, USA)
- LightCycler[®] (Fa. Roche, D)
- PC HP Vectra VL mit LC Software Version 3.5 (Fa. Roche, D)
- LightCycler[®] Carousel Centrifuge (Fa. Roche, D)

8.2 Anhang zu "Ergebnisse"

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
G 108/2	LM	<i>stx1</i>	
G 36/1	LM		<i>stx2e</i>
G 468/1	LM		<i>stx2e</i>
G 468/2	LM		<i>stx2e</i>
G 500 1a	LM		<i>stx2/2c</i>
G 500 2/1	LM		<i>stx2e</i>
G 511/4	LM	<i>stx1</i>	<i>stx2d</i>
K 121/2	LM		<i>stx2/2c</i>
K 133/3	LM		<i>stx2/2c</i>
K 38/2	LM	<i>stx1</i>	
L 193 STX 1	LM	<i>stx1</i>	
L 194 STX 1	LM	<i>stx1</i>	
L 194-1 STX 2	LM		<i>stx2/2c</i>
K 69/1	LM	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
K 76/2	LM	<i>stx1</i>	
K 69	LM	<i>stx1</i>	
K 76/1	LM	<i>stx1</i>	
M 27	LM	<i>stx1c</i>	
173a 1877-29	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 190-29	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 106 I/1	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 I/2	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 I/3	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 106 I/4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 I/5	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 I/7	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 I/8	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/13	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/16	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/18	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/26	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/5	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/7	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 II/8	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 III/15	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 III/6	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 106 IV/1	Fäzes		<i>stx2d</i>

Tabelle 31: Isolate mit Herkunft und per Schmelzkurvenanalyse detektierten Shigatoxintypen

(OW = Oberflächenwasser, TW = Trinkwasser, LM = Lebensmittel)

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
180a 115-1	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 115-2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 115-3	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 115-5	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 124 I Pos.26	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 124 II Pos. 28	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 124 III	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 125/1	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 125/21	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 129/2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 129/7	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 129/8	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 138/1	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 138/2	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 138/3	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 138/4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 138/5	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 138/7	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 138/8	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 142-2	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 142-41	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 142-47	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 142-48	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 142-50	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 142-7	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 143/1	Fäzes		<i>stx2d</i>
180a 146/1	Fäzes		<i>stx2d</i>
180a 146/2	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 156 Z4	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 156 Z6	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 172-4 STX 1	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 180-1	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 180-10	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 180-2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 180-3	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 180-5	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 190-10	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 190-20	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 190-35	Fäzes		<i>stx2d, stx2/2c</i>
180a 190-38 STX 1, 2	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>

Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
180a 190-38 STX 2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 190-42	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 191-15	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-16	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-17	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-17 STX 1, 2	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2e</i>
180a 191-18	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-19	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 191-2	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 191-20	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-24	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 191-3	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 191-30	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 191-7	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 83-25	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 84-11	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 84-12 STX 2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 84-3	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 84-5	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 90	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 99-1	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 99-18	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 99-4	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2e</i>
180a 99-4 STX 1	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 99-5	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 99-8	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 99-9	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 100-1	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 100-7	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 101-11	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 101-5	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 101-8	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a 27-22	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 27-26	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 27-27	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 27-30	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 27-5	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a 36 Kä/01	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 36 -S2/01	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a 36-S1/01	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>

Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
180a 54-1	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 54-2	Fäzes		<i>stx2d</i>
180a 54-3	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 54-4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 54-6	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 54-7	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 66E	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a 88-1	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 88-3	Fäzes		<i>stx2d</i>
180a 88-4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a 88-5	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 88-7	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 88-8	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 89-1	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 89-2	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a 89-3	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a-z-2339-41-1	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a-z-2339-91-1	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-3378/1	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-3378/17	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-3378/18	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-4649 20-1	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a-z-4649 21-3	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a-z-6586-18	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a-z-798/25	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-798/31	Fäzes	<i>stx1</i>	
180a-z-800	Fäzes	<i>stx1c</i>	
210b 61-15	Fäzes	<i>stx1c</i>	
210b 61-17	Fäzes	<i>stx1c</i>	
210b 61-3	Fäzes	<i>stx1c</i>	
5129-25	Fäzes	<i>stx1</i>	
L376Blot	Fäzes		<i>stx2e</i>
180a-z-5280 stx2	Fäzes		<i>stx2/2c</i>
180a-z-669-2	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-2436	Fäzes	<i>stx1c</i>	
180a-z-669	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
180a-z-5491/1	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a-z-5491/3	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a-z-5491/4	Fäzes	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
180a-z-5280	Fäzes	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>

Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
WA 1032	OW		<i>stx2e</i>
WA 1410	OW		<i>stx2e</i>
WA 1418	OW		<i>stx2e</i>
WA 1693-1/1	OW	<i>stx1</i>	
WA (TW) 4358/01	TW		<i>stx2/2c</i>
WA 4628	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 4704	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 4711	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 6095	OW	<i>stx1</i>	
WA 6863	OW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 8265	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 9446	TW	<i>stx1</i>	
TW 9453	TW	<i>stx1</i>	
WA 10388	OW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 14850	TW		<i>stx2e</i>
WA 14912/1	OW		<i>stx2e</i>
WA 3383 I/2	OW		<i>stx2/2c</i>
TW 7708 I/1	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 6894	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 11967/00	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 12168/01	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 13169	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 1364/00	TW		<i>stx2d</i>
WA (TW) 14582	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 15797	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 1667/00	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 1668/00	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 1948/99	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 4515/00	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 5113	TW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA (TW) 5114	TW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA (TW) 5124	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 5313/01	TW	<i>stx1</i>	
WA (TW) 5751/01	TW		<i>stx2d</i>
WA (TW) 6884	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 7307	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 7410/00	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 8237/01	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 8619/00	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 8983/01	TW	<i>stx1</i>	

Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
WA (TW) 9387/01	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 9660 STX 1	TW	<i>stx1</i>	
WA (TW)1133/01	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)12033 A	TW	<i>stx1</i>	
WA (TW)13716	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)13878/00	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)13880/00 STX 1	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2e</i>
WA (TW)14580	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)14749/00	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW)14750/00	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW)14960	TW	<i>stx1</i>	
WA (TW)15662	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)16262/99	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW)16530/99	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW)16532/99	TW	<i>stx1</i>	
WA 10012/99	OW		<i>stx2e</i>
WA 10457-1	OW		<i>stx2e</i>
WA 10542/00	OW		<i>stx2d</i>
WA 10645/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 10697/01	OW	<i>stx1</i>	
WA (TW) 10874/00	TW		<i>stx2e</i>
WA 11028-1	OW	<i>stx1c</i>	
WA 11148/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 11659/99	OW		<i>stx2e</i>
WA 12135	OW		<i>stx2e</i>
WA 12224/00	OW		<i>stx2d</i>
WA 12228/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 12229/00	OW	<i>stx1</i>	
WA 12238/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 12315/00	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 12533/00	OW	<i>stx1</i>	
WA 12735/99	OW	<i>stx1</i>	
WA 13056-98	OW	<i>stx1</i>	
WA 13183-98	OW	<i>stx1d</i>	
WA 13229/00 GN	OW		<i>stx2e</i>
WA 13434	OW	<i>stx1</i>	
WA 13527	OW		<i>stx2e</i>
WA 13531/00	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 13714	TW		<i>stx2e</i>
WA 1379 -1	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>

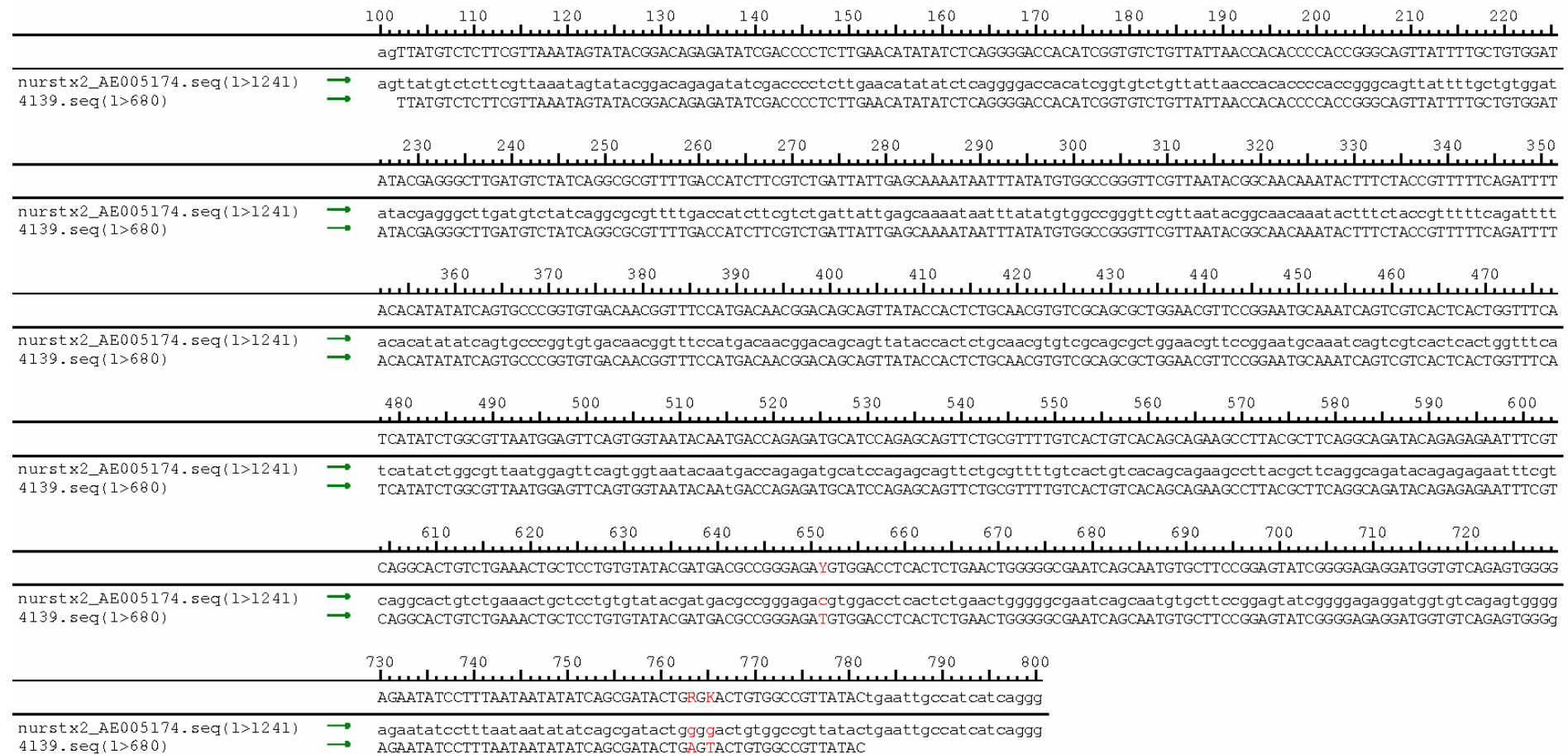
Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
WA (TW) 13880/00 STX 2	TW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 14752/00	TW		<i>stx2/2c</i>
WA 14921/00	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 15064-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 15158-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 15615-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 15971/99	OW	<i>stx1</i>	
WA 1609	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 16546/99	OW	<i>stx1</i>	
WA 17015	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 17017	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 17017 STX 1	OW	<i>stx1c</i>	
WA 17018	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 17019	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 17020	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 17121/99	OW		<i>stx2e</i>
WA 2068-99	OW		<i>stx2d</i>
WA 2167	OW	<i>stx1</i>	
WA 2198/01	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 2210/01	OW		<i>stx2e</i>
WA 2446/01	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 2483/99	OW	<i>stx1c</i>	
WA 2789/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 3205/99	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 3254/99	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 3526/99	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 4141-99	OW		<i>stx2e</i>
WA 4202	OW		<i>stx2e</i>
WA 5040	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 5374/00	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 5413/99	OW		<i>stx2d</i>
WA 5784-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 5791-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 5840-1-98	OW	<i>stx1</i>	
WA 5840-2-98	OW	<i>stx1</i>	
WA 5840-3-98	OW	<i>stx1</i>	
WA 5851/00	OW		<i>stx2e</i>
WA 6766-99	OW	<i>stx1</i>	
WA 677	OW		<i>stx2e</i>
WA 6773-98	OW		<i>stx2e</i>

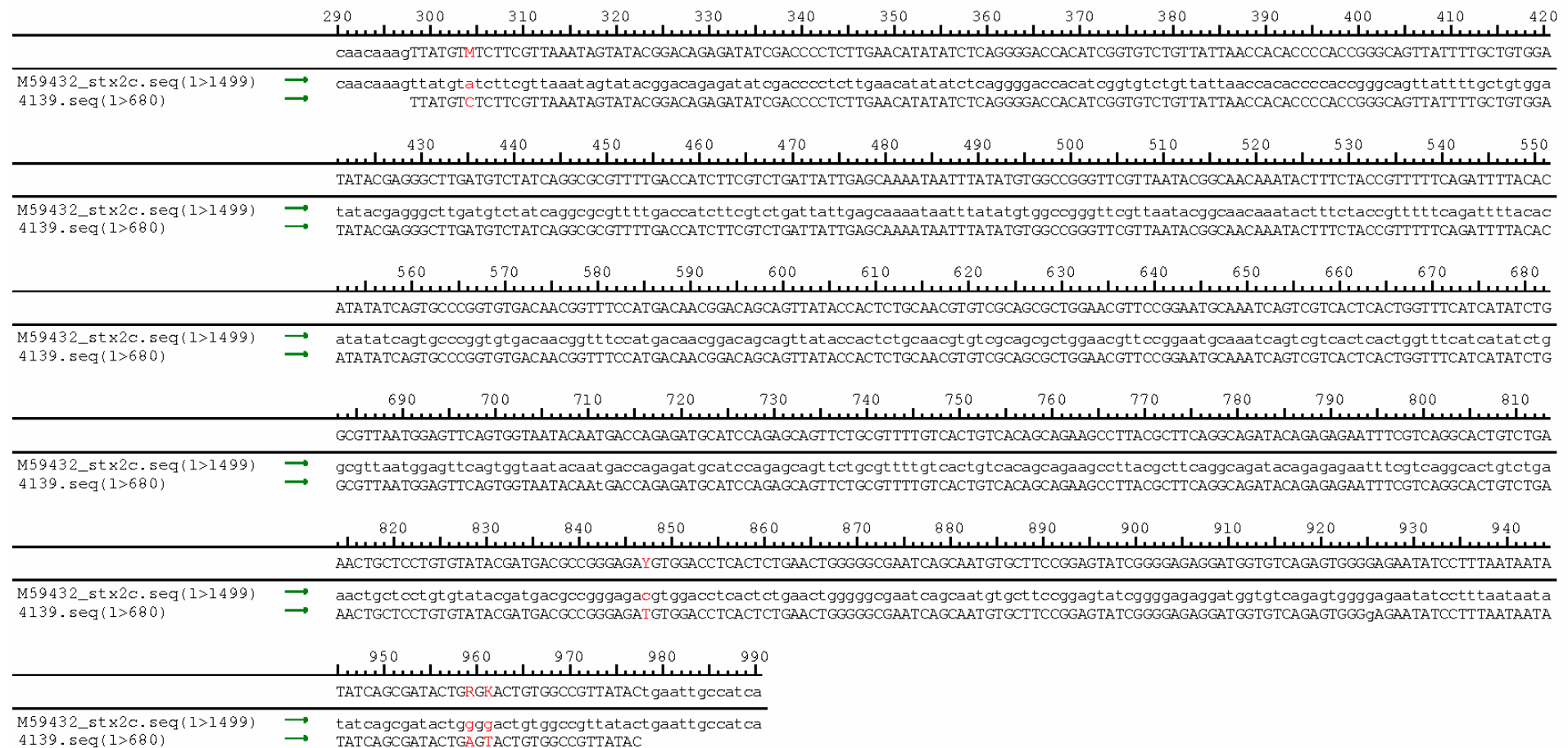
Fortsetzung Tabelle 31

Isolatbezeichnung	Matrix	Shigatoxingruppe 1	Shigatoxingruppe 2
WA 6780-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 6827/00	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 7307/00	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 7408	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 7696/00	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 7811	OW	<i>stx1c</i>	
WA 7947/00	OW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 8066/99	TW		<i>stx2e</i>
WA 8365/99	OW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 8523/99	TW	<i>stx1d</i>	
WA 8577/99	OW		<i>stx2d</i>
WA 8872/01	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 8947/01 STX 2	OW		<i>stx2d</i>
WA 8949/01	OW	<i>stx1c</i>	<i>stx2d</i>
WA 8951/01	OW		<i>stx2e</i>
WA (TW) 9083/99	TW		<i>stx2/2c</i>
WA 9316/99	OW		<i>stx2e</i>
WA 9373/01	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 9401/00	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 9614/99	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 9652/99	OW	<i>stx1</i>	
WA 9798-4	OW		<i>stx2/2c</i>
WA 9838-98	OW		<i>stx2e</i>
WA 9840-98	OW		<i>stx2e</i>
WA(TW) 9979/99	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 9980/99	TW	<i>stx1</i>	<i>stx2/2c</i>
WA 4908-98	OW	<i>stx1d</i>	
WA (TW) 9854/00 STX 2	TW		<i>stx2/2c</i>
WA (TW) 4515/00 -53-	TW		<i>stx2e</i>

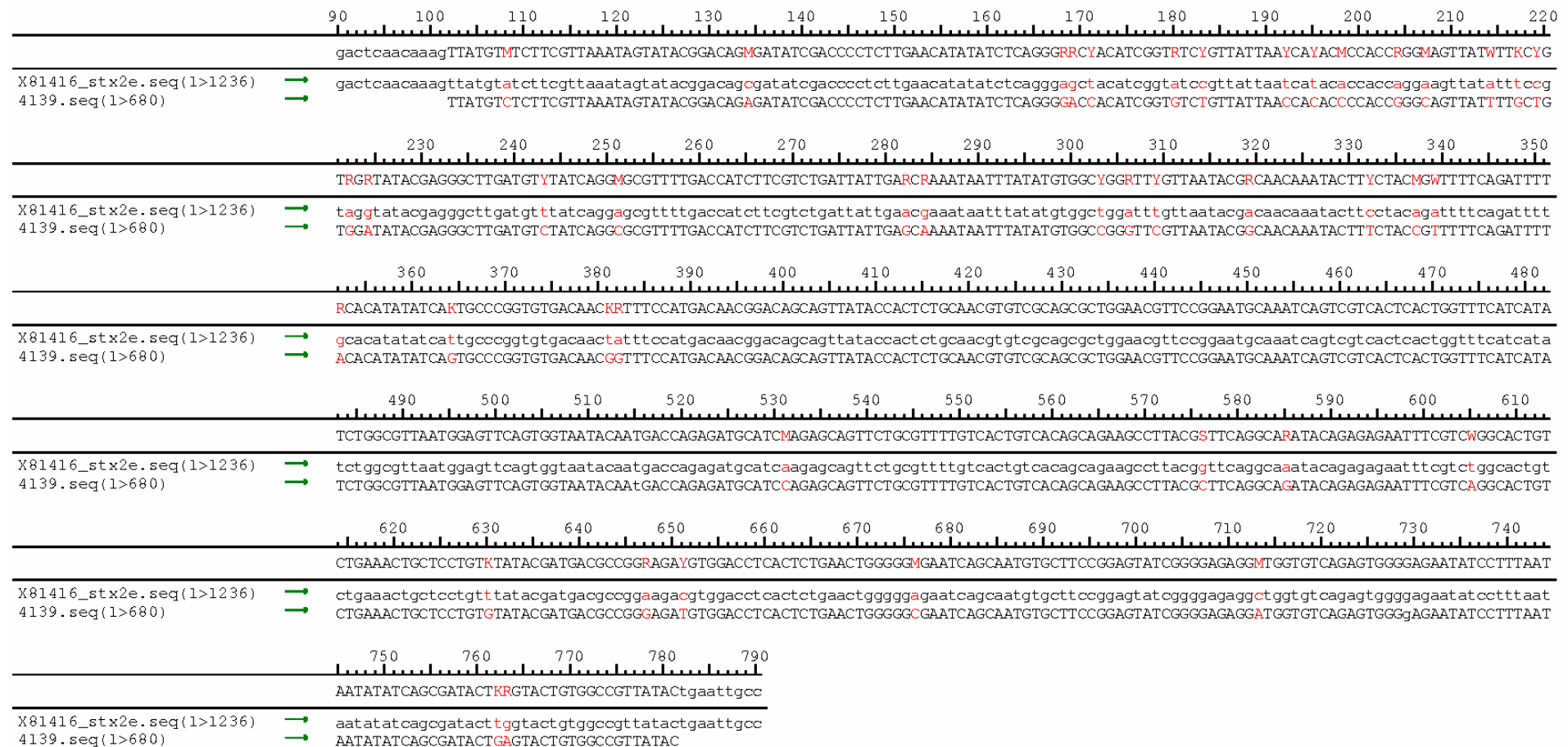
Fortsetzung Tabelle 31



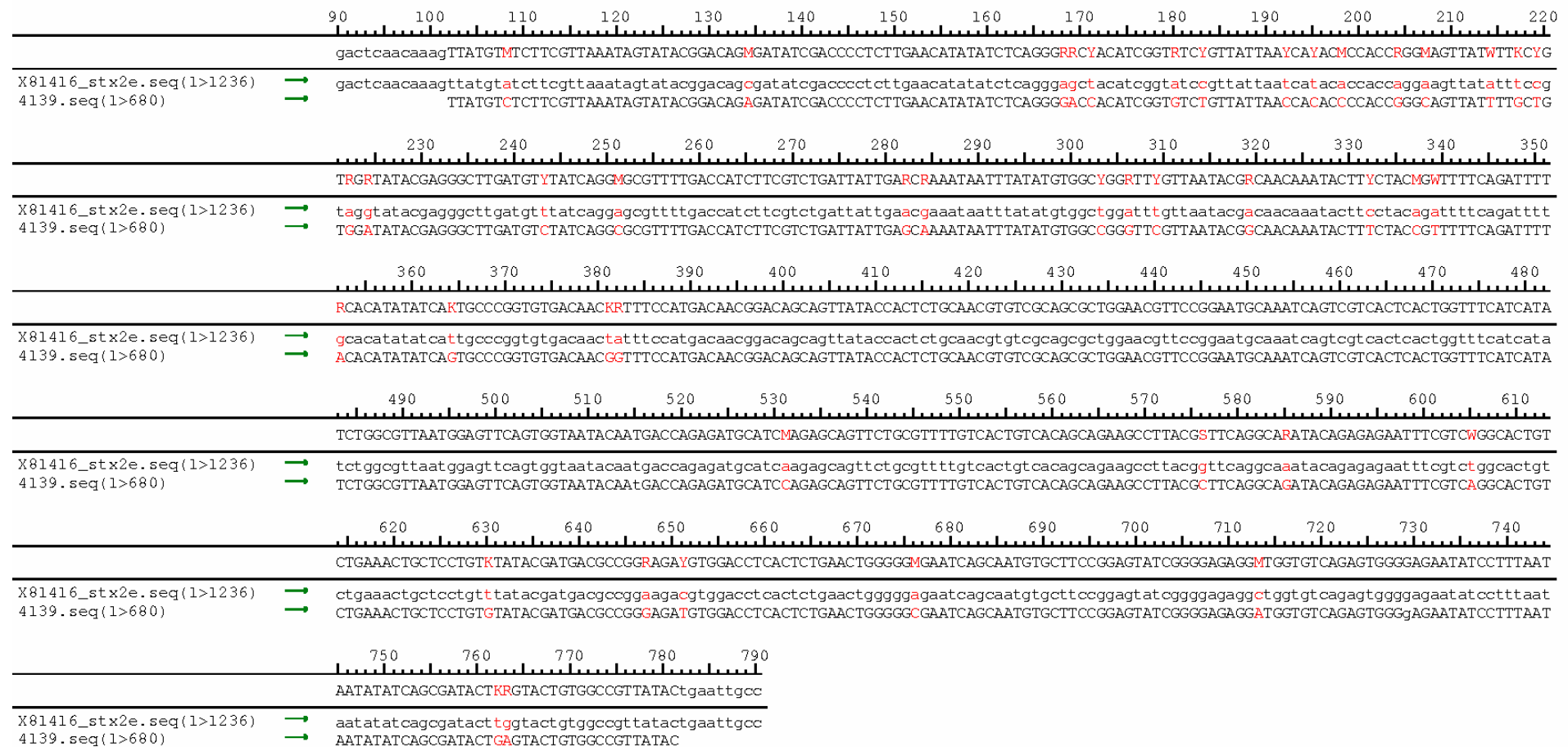
Grafik 19: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2*: 3 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (99,6 % Sequenzhomologie)



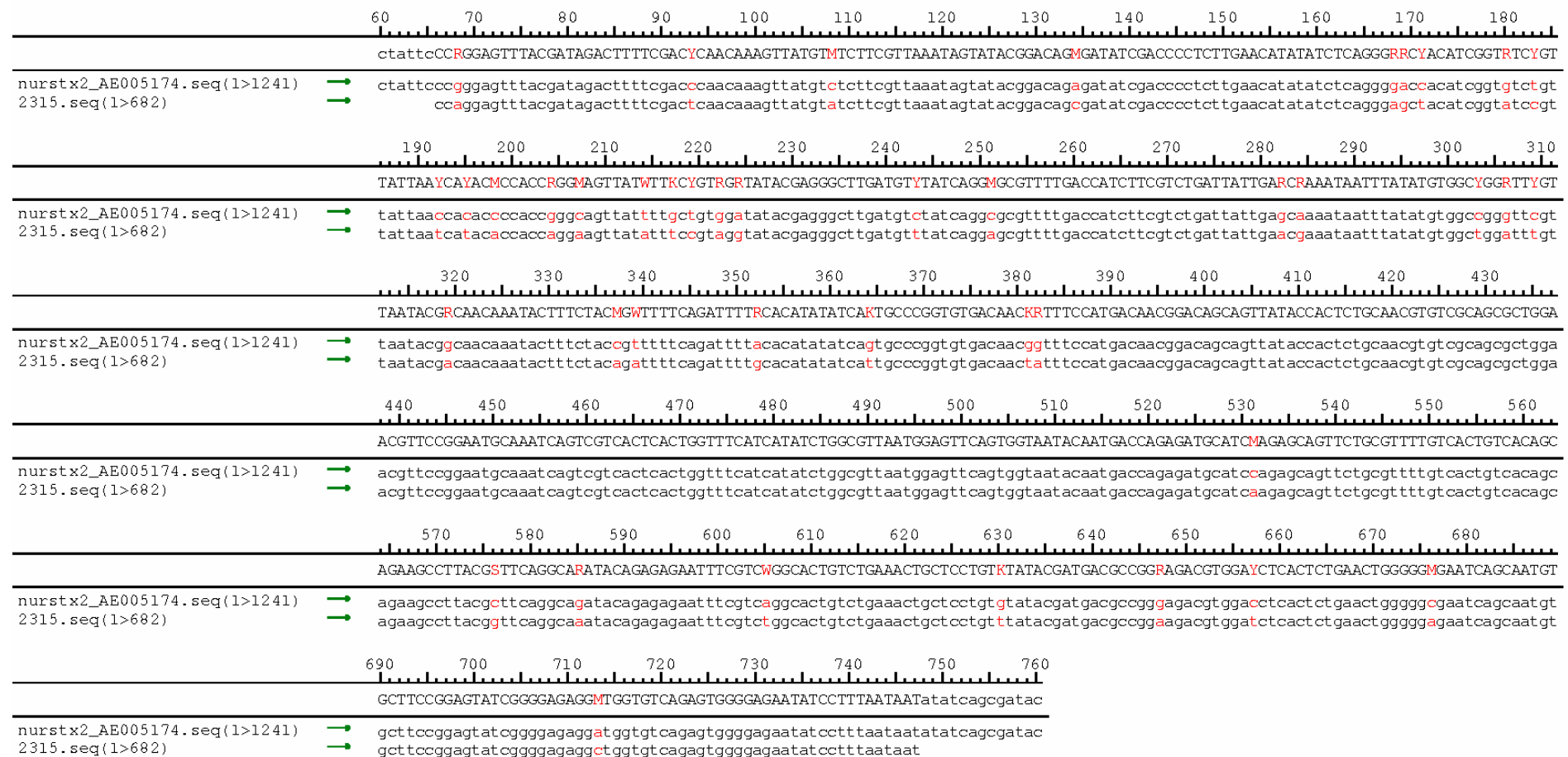
Grafik 20: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2c*: 4 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (99,4 % Sequenzhomologie)



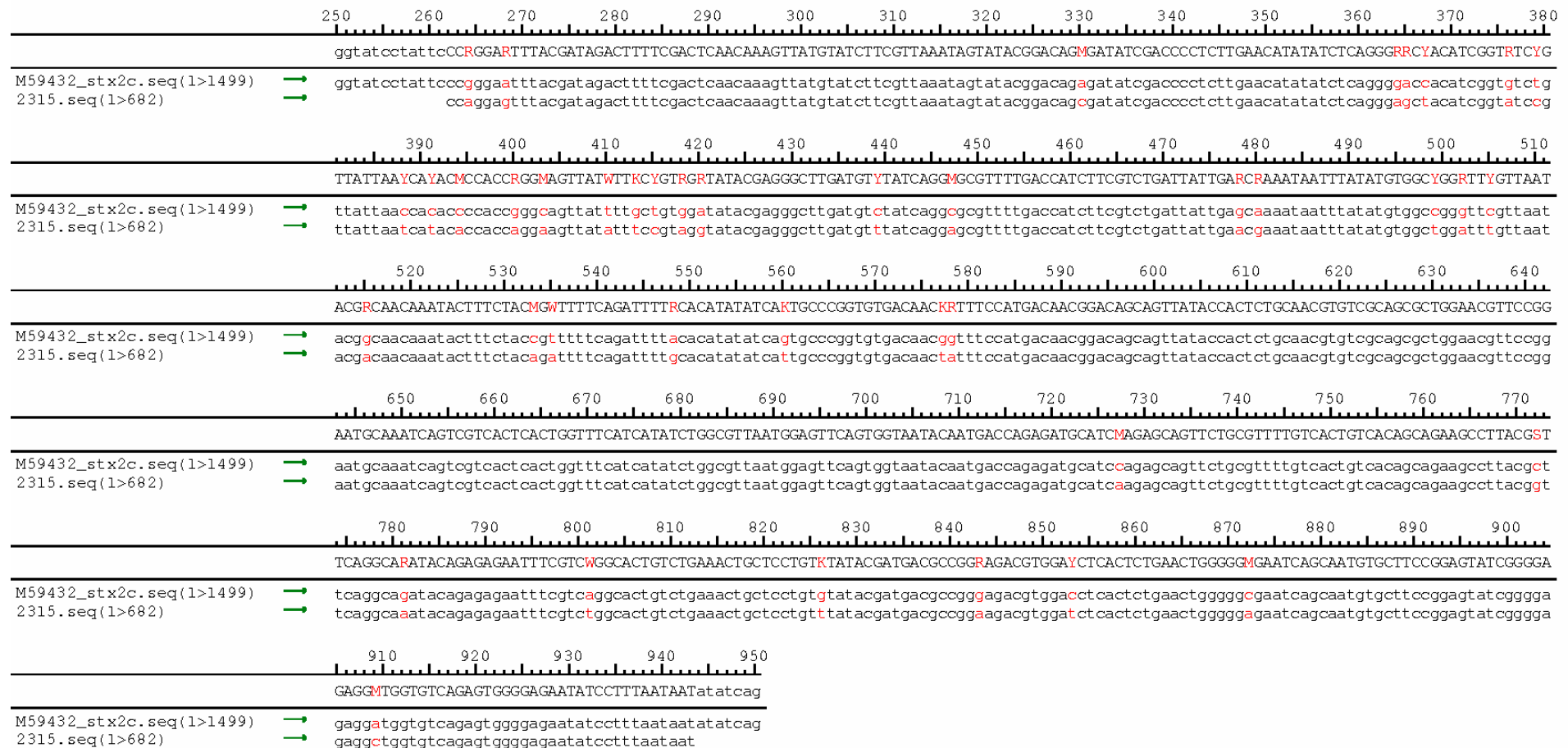
Grafik 21: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2d*: 29 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (95,7 % Sequenzhomologie)



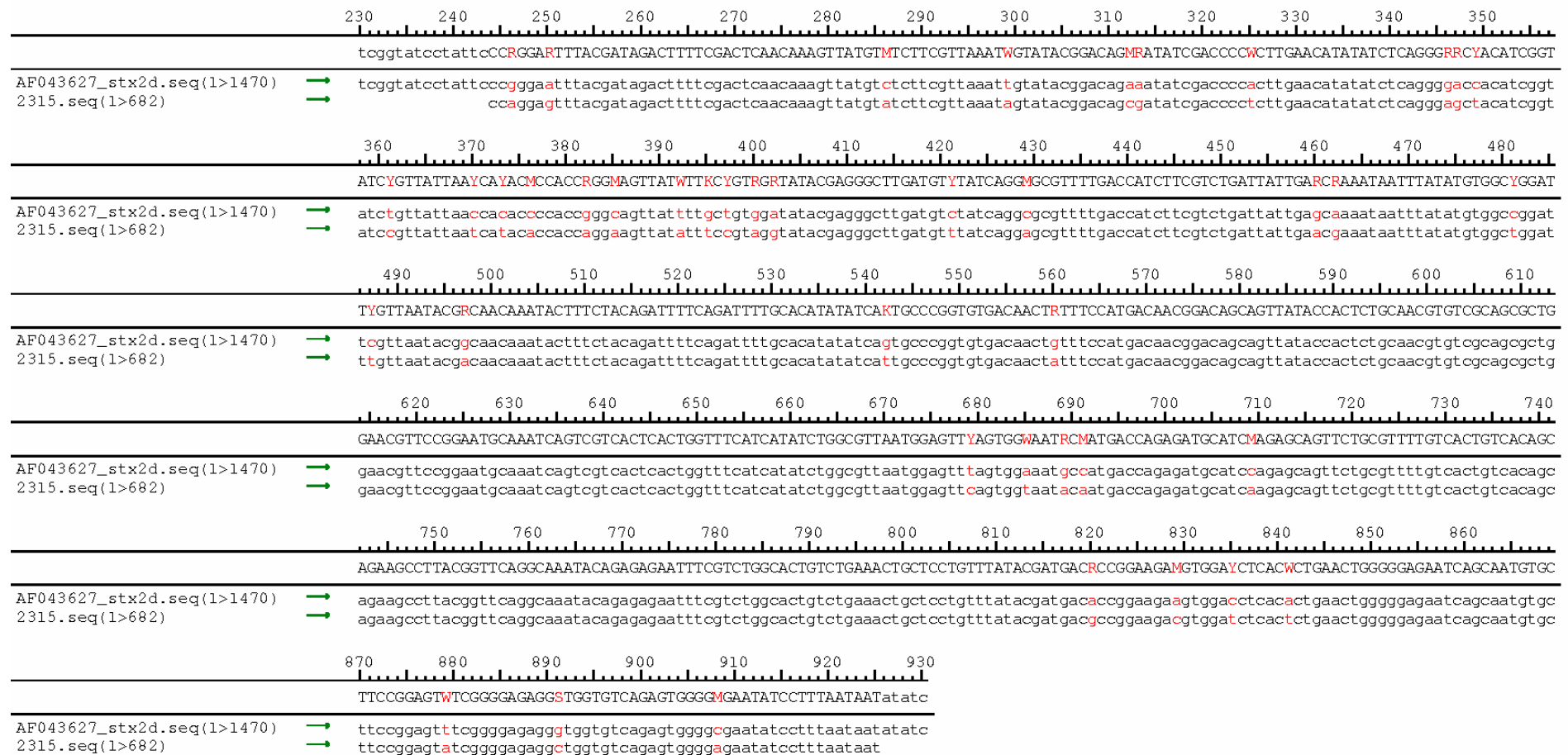
Grafik 22: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2e*: 43 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (93,7 % Sequenzhomologie)



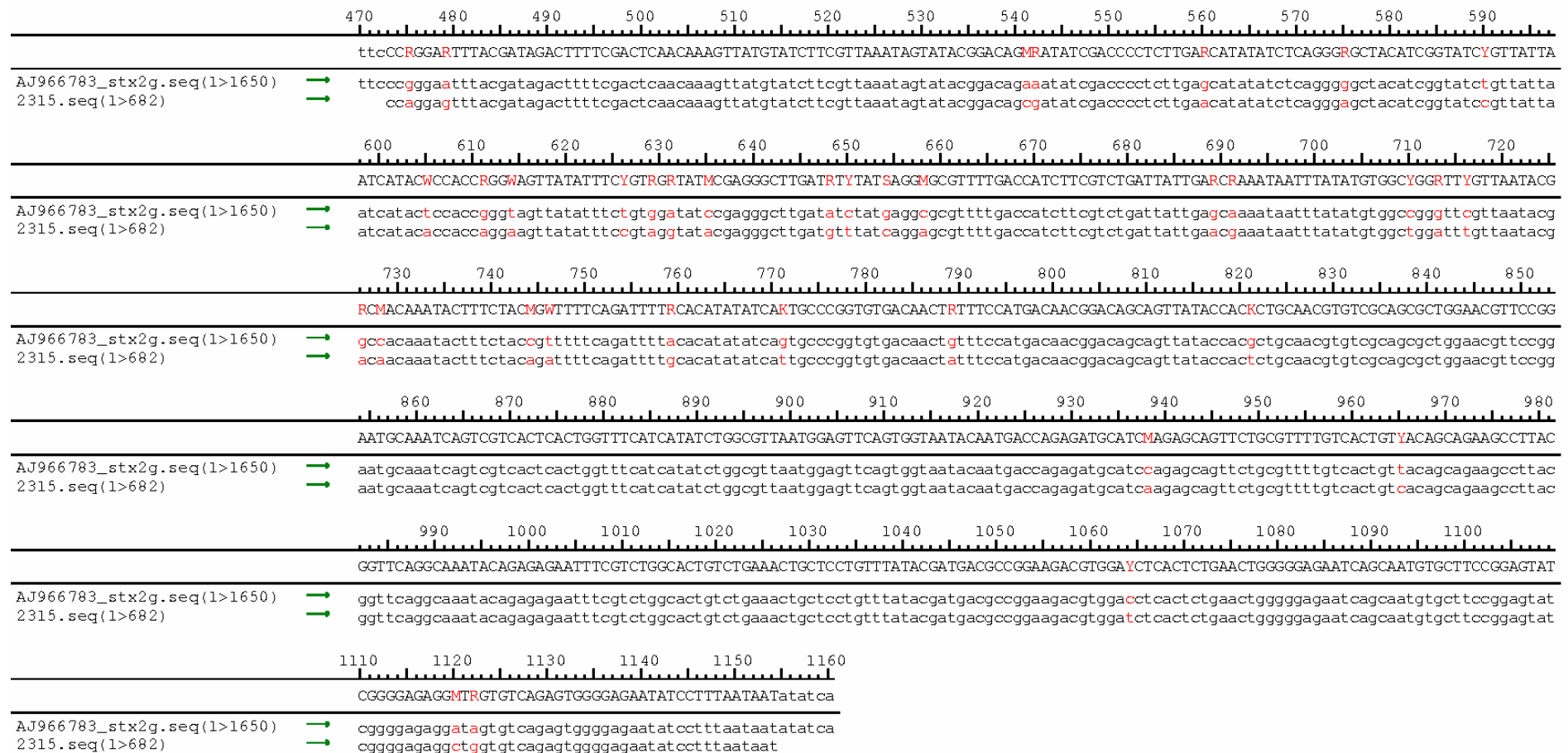
Grafik 23: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2*: 42 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (93,8 % Sequenzhomologie)



Grafik 24: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2c*: 40 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (94,1 % Sequenzhomologie)



Grafik 25: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2d*: 42 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (93,8 % Sequenzhomologie)



Grafik 26: Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms *stx2e*: 2 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (99,7 % Sequenzhomologie)

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
consensus		TGTTAGCTCAGCCGGACAGAGCAATTGCCCTTCTAAGCAATCGGTCACTGGTTTGAATCCAGTACAACGCGCCACACTTATTTTCCCGGGCTCGCTTTTGCGG									
L193 stx2.seq(1>1300)	→	TGTTAGCTCAGCCGGACAGAGCAATTGCCCTTCTAAGCAATCGGTCACTGGTTTGAATCCAGTACAACGCGCCACACTTATTTTCCCGGGCTCGCTTTTGCGG									
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
consensus		GCCTTTTTTATATCTGCGCCGGGTCGGTGCTGATTACTTCAGCCAAAAGGAACACCTGTATATGAAGTGTATATTATTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTAC									
L193 stx2.seq(1>1300)	→	GCCTTTTTTATATCTGCGCCGGGTCGGTGCTGATTACTTCAGCCAAAAGGAACACCTGTATATGAAGTGTATATTATTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTAC									
AY443054_v_deBaets.seq(1>1241)	→	atgaagtgtatattatTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTAC									
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
consensus		TGGGTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCGGGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
L193 stx2.seq(1>1300)	→	TGGGTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCGGGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
AY443054_v_deBaets.seq(1>1241)	→	tgggTTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCGGGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
1013.seq(1>686)	→	TCCCGGGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
5860.seq(1>727)	→	AGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
84-16.seq(1>520)	→	GATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
84-19.seq(1>520)	→	CCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
99-19.seq(1>512)	→	AACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
14765.seq(1>690)	→	AGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
9660.seq(1>616)	→	GTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
7030.seq(1>536)	→	TTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
4139.seq(1>694)	→	TTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
84-15.seq(1>495)	→	TATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
14546.seq(1>495)	→	TATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
5857.seq(1>689)	→	GTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
8947.seq(1>523)	→	TTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGA									
1212-6.seq(1>490)	→	AGTATACGGACAGAGATATCGA									
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
consensus		CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
L193 stx2.seq(1>1300)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
AY443054_v_deBaets.seq(1>1241)	→	cccccttgaacatatatctcaggggaccacatcgggtgtctgtttattaaacacacccccacgggagttattttgctgtggatatacagagggcttgatgtct									
1013.seq(1>686)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
5860.seq(1>727)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
84-16.seq(1>520)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
84-19.seq(1>520)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
99-19.seq(1>512)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
14765.seq(1>690)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
9660.seq(1>616)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
7030.seq(1>536)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
4139.seq(1>694)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
84-15.seq(1>495)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
14546.seq(1>495)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
5857.seq(1>689)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
8947.seq(1>523)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
1212-6.seq(1>490)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
180-7.seq(1>398)	→	CCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACACACCCACCGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
16077.seq(1>590)	→	CGGGCAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
5320.seq(1>724)	→	CAGTTATTTTGTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCT									
180-12.seq(1>640)	→	GATGTCT									

Grafik 27: Gensequenzen der Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit DNA-Sequenz-Übereinstimmung zur Variante ECB-217 von De Baets et al. (2004); Accession-Nr. AY443054

		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510
consensus		ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
AY443054 v deBaets.seq (1>1241)	→	atcaggcgcgTTTTgaccatcttcgctcgattattgagcaaaaataaTTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
1013.seq (1>686)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
5860.seq (1>727)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
84-16.seq (1>520)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
84-19.seq (1>520)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
99-19.seq (1>512)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
14765.seq (1>690)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
9660.seq (1>616)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
7030.seq (1>536)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
4139.seq (1>694)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
84-15.seq (1>495)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
14546.seq (1>495)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
5857.seq (1>689)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
8947.seq (1>523)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
1212-6.seq (1>490)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
180-7.seq (1>398)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
16077.seq (1>590)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
5320.seq (1>724)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
180-12.seq (1>640)	→	ATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTCGATTATTGAGCAAAATAAATTTATATGTGGCCGGGTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAG										
		520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	
consensus		ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
AY443054 v deBaets.seq (1>1241)	→	attttacacatatatcagtgcccggtgtgacaacggTTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
1013.seq (1>686)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
5860.seq (1>727)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
84-16.seq (1>520)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
84-19.seq (1>520)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
99-19.seq (1>512)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
14765.seq (1>690)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
9660.seq (1>616)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
7030.seq (1>536)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
4139.seq (1>694)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
84-15.seq (1>495)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
14546.seq (1>495)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
5857.seq (1>689)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
8947.seq (1>523)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
1212-6.seq (1>490)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
180-7.seq (1>398)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
16077.seq (1>590)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
5320.seq (1>724)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
180-12.seq (1>640)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
84-12.seq (1>481)	→	ATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAA										
		620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	
consensus		TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
AY443054 v deBaets.seq (1>1241)	→	tgcaaatcagtcgctcactcactcactggttttcacatcatatctggcgTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
1013.seq (1>686)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
5860.seq (1>727)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
84-16.seq (1>520)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
84-19.seq (1>520)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										
99-19.seq (1>512)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAAACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG										

Fortsetzung Grafik 27

		620	630	640	650	660	670	680	690	700	710
consensus		TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
14765.seq (1>690)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
9660.seq (1>616)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
7030.seq (1>536)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
4139.seq (1>694)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
84-15.seq (1>495)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
14546.seq (1>495)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
5857.seq (1>689)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
8947.seq (1>523)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
1212-6.seq (1>490)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
180-7.seq (1>398)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
16077.seq (1>590)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
5320.seq (1>724)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
180-12.seq (1>640)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
84-12.seq (1>481)	→	TGCAAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
1877-22.seq (1>424)	→	TCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGCAGTTCTGCGTTTTG									
		720	730	740	750	760	770	780	790	800	810
consensus		TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
L193 stx2.seq (1>1300)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
AY443054 v deBaets.seq (1>1241)	→	tcactgtcacagcagaagccttacgccttcaggcagatcacagagagaattttcgctcaggcactgtctgaaactgctcctgtgtatagcatgacgccgggagatg									
1013.seq (1>686)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
5860.seq (1>727)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
84-16.seq (1>520)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAA									
84-19.seq (1>520)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCT									
99-19.seq (1>512)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCAC									
14765.seq (1>690)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
9660.seq (1>616)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
7030.seq (1>536)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGA									
4139.seq (1>694)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
84-15.seq (1>495)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAA									
14546.seq (1>495)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAA									
5857.seq (1>689)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
8947.seq (1>523)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTAT									
1212-6.seq (1>490)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCAC									
16077.seq (1>590)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
5320.seq (1>724)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
180-12.seq (1>640)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
84-12.seq (1>481)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
1877-22.seq (1>424)	→	TCACTGTACAGCAGAGAAGCCTTACGCCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGGCACCTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATG									
		820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
consensus		TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
L193 stx2.seq (1>1300)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
AY443054 v deBaets.seq (1>1241)	→	tggacctcaactctgaaactgggggCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
1013.seq (1>686)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATAT									
5860.seq (1>727)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATCAG									
14765.seq (1>690)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
9660.seq (1>616)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
4139.seq (1>694)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
5857.seq (1>689)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
16077.seq (1>590)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
5320.seq (1>724)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
180-12.seq (1>640)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									
84-12.seq (1>481)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG									

Fortsetzung Grafik 27

		820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	
consensus		TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATATATCAG										
1877-22.seq (1>424)	→	TGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGgAGAATATCCTTTAATAATATATCAG										
		920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020
consensus		CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
AY443054_v deBaets.seq (1>1241)	→	cgatactgagtactgtggccgttatactgaattgccatcatcagggggcgcggttctgttcgcgccgtgaatgaagagagtcaaccagaatgtcagataactg										
5860.seq (1>727)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCA										
14765.seq (1>690)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGC										
4139.seq (1>694)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCAT										
5857.seq (1>689)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCA										
16077.seq (1>590)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCAT										
5320.seq (1>724)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
180-12.seq (1>640)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
84-12.seq (1>481)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
1877-22.seq (1>424)	→	CGATACTGAGTACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGGGCGCGTTCTGTTCGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTG										
		1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	
consensus		GCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTAAAT										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	GCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTAAAT										
AY443054_v deBaets.seq (1>1241)	→	gcgacagggcccggttataaaaaataaacaatacattatgggaaagtaatacagcagcagcggttctgtgaacagaaagtcacagtttttatatacaacgggtaaat										
5320.seq (1>724)	→	GCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCAGCAGCGTTTCTGAACAGAAAG										
180-12.seq (1>640)	→	GCGACAGGCCCGTTATAAAAA										
84-12.seq (1>481)	→	GCGACAGGCCCGTTATAAAAAATAACAATAC										
1877-22.seq (1>424)	→	GCGACAGGCCCGTTATAAAAAAT										
		1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	
consensus		AAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTATTTGCATTGGTTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTC										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	AAAGGAGTTAAGTATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTATTTGCATTGGTTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGAGTTTTC										
AY443054_v deBaets.seq (1>1241)	→	aaaggagttaaagtatgaagaagatgtttatggcggttttatttgcattggtttctgttaatgcaatggcgcggtattgtgctaaaggtaaaattgagttttc										
		1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	
consensus		CAAGTATAATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGCAAccgttactgcaaagtgtcagctgac										
L193 stx2.seq (1>1300)	→	CAAGTATAATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGCAA										
AY443054_v deBaets.seq (1>1241)	→	caagtataatgaggatgacacatttacagtgaagggttgacgggaaagaatactggaccagtcgctggaatctgcaaccgttactgcaaagtgtcagctgac										
		1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400			
consensus		aggaatgactgtcacaaatcaaataccagtacctgtgaatcagggtccggatttgcagtgcaagtgcagtttaataatgactga										
AY443054_v deBaets.seq (1>1241)	→	aggaatgactgtcacaaatcaaataccagtacctgtgaatcagggtccggatttgcagtgcaagtgcagtttaataatgactga										

Fortsetzung Grafik 27

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
consensus		ataacagggttggttggtgcggggttcgagtcctggatggcggtccattatctgcacatgcgttgtagctcagtcggacagagcaattgccttctaagcaa									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	ataacagggttggttggtgcggggttcgagtcctggatggcggtccattatctgcacatgcgttgtagctcagtcggacagagcaattgccttctaagcaa									
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
consensus		tcggtcactggttcgaatccagtcacaacgcgcacacacttatcttcctggctcgctctcgcggtctttttgtatctgcgcgggtctggtaetgattacct									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	tcggtcactggttcgaatccagtcacaacgcgcacacacttatcttcctggctcgctctcgcggtctttttgtatctgcgcgggtctggtaetgattacct									
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
consensus		tagccaaaagggaatatatgtatatgaagtgtatattgttaaagtggtactgtgcctgttactgggtttttcttcgggtatcctattccCAGGAGTTTACGAT									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	tagccaaaagggaatatatgtatatgaagtgtatattgttaaagtggtactgtgcctgttactgggtttttcttcgggtatcctattccCAGGAGTTTACGAT									
2315.seq(1>682)	→	tagccaaaagggaatatatgtatatgaagtgtatattgttaaagtggtactgtgcctgttactgggtttttcttcgggtatcctattccCAGGAGTTTACGAT									
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
consensus		AGACTTTTCGACTCAACAAAGTTATGTATCTTCGTTAAATAGTATACGACACGCGATATCGACCCCTCTTGAACATATATCTCAGGGAGCTACATCGGTATC									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	agactttttcgactcaacaaagttatgtatcttcggttaaataagtagtatacggacacgcatatcgaccctcttgaacatatatctcaggagagctacatcggtatc									
2315.seq(1>682)	→	agactttttcgactcaacaaagttatgtatcttcggttaaataagtagtatacggacacgcatatcgaccctcttgaacatatatctcaggagagctacatcggtatc									
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	510
consensus		CGTTATTAATCATACACCACCAGGAAGTTATATTTCCGTAGGTATACGAGGGCTTGATGTTTATCAGGAGCGTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAACG									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	cgttattaatcatacaccaccaggaagttatatatttcgtaggtatacaggggcttgatggtttatcaggagcggttttgaccatcttcgctgattattgaacg									
2315.seq(1>682)	→	cgttattaatcatacaccaccaggaagttatatatttcgtaggtatacaggggcttgatggtttatcaggagcggttttgaccatcttcgctgattattgaacg									
		520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
consensus		AAATAATTTATATGTGGCTGGATTGTTAATACGACAACAAATACTTTCTACAGATTTTCAGATTTTGACATATATCATTGCCCGGTGTGACAACATTTTC									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	aaataatttatatgtggctggatttgtaatacgcacaacaaatactttctacagattttcagattttgcacatatatcattgcccggtgtgacaactatttc									
2315.seq(1>682)	→	aaataatttatatgtggctggatttgtaatacgcacaacaaatactttctacagattttcagattttgcacatatatcattgcccggtgtgacaactatttc									
		620	630	640	650	660	670	680	690	700	710
consensus		CATGACAACGGACAGCAGTTATACCACTCTGCAACGTGTCGACGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCATATCTGGC									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	catgacaacggacagcagttataccactctgcaacgtgtgcagcgctggaacgtttccggaatgcaaatcagtcgctcactcactggtttcatcatatctggc									
2315.seq(1>682)	→	catgacaacggacagcagttataccactctgcaacgtgtgcagcgctggaacgtttccggaatgcaaatcagtcgctcactcactggtttcatcatatctggc									
		720	730	740	750	760	770	780	790	800	810
consensus		GTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCAAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACCTGTCACAGCAGAAGCCTTACGGTTCAGGCAATACA									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	gttaatggagttcagtggttaataacaatgaccagagatgcatcaagagcagttctgcgttttgcactgtcacagcagaagccttaacggttcaggcaaataca									
2315.seq(1>682)	→	gttaatggagttcagtggttaataacaatgaccagagatgcatcaagagcagttctgcgttttgcactgtcacagcagaagccttaacggttcaggcaaataca									
		820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
consensus		GAGAGAAATTCGTCTGGCACTGTGTAACTGCTCCTGTTTATACGATGACGCCGGAAGACGTGGATCTCACTCTGAAGTGGGGGAGAATCAGCAATGTGCT									
AJ313016_V_Reischl.seq(1>1509)	→	gagagaatttcgtctggcactgtctgaaactgctcctgtttatacagatgacgcgggaagacgtggatctcactctgaactgggggagaatcagcaatgtgct									
2315.seq(1>682)	→	gagagaatttcgtctggcactgtctgaaactgctcctgtttatacagatgacgcgggaagacgtggatctcactctgaactgggggagaatcagcaatgtgct									

Grafik 28: Gensequenzen der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C der Isolate mit DNA-Sequenz-Übereinstimmung zur Variante 3615-99 von Reischl et al. (2002); Accession-Nr.: AJ313016

		920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	
consensus		TCCGGAGTATCGGGGAGAGGCTGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAATATCCTTTAATAATatcagcgataacttggtactgtggccgttatactgaattgccatca											
AJ313016_V Reischl.seq(1>1509)	→	tccggagtatcggggagagagctggtgtcagagtggggagaaatcctttaataatatacagcgataacttggtactgtggccgttatactgaattgccatca											
2315.seq(1>682)	→	tccggagtatcggggagagagctggtgtcagagtggggagaaatcctttaataat											

Fortsetzung Grafik 28

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AGEV	Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz
ALTS	Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene tätigen Sachverständigen
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CHO-Zellen	Ovarzellen des chinesischen Hamsters
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
E	Energie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FL	Fluoreszein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
Gb ₃	Globotriosylceramid
Gb ₄	Globotetraosylceramid
HeLa-Zellen	Zellkulturlinie gewonnen aus Zervixkarzinomzellen der Patientin Frau Henrietta Lacks
HEp-2-Zellen	Mit HeLa-Zellen kontaminierte Zelllinie, die ursprünglich auf eine aus einem humanen Larynxkarzinom gewonnene Linie zurückgeführt wurde
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz

kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheiten
LC	Lightcycler®
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LM	Lebensmittel
n.b.	nicht bekannt
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTEC	Nekrotoxische <i>E. coli</i>
OW	Oberflächenwasser
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ph	Phosphat
Red 640	Rot 640-N-Hydroxy-Succinimid-Ester
Red 705	Rot 705-Phosphoramidit
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Seite
SLT	Shigalike-Toxin
SLTEC	Shigalike-Toxinbildende <i>E. coli</i>
STEC	Shigatoxinbildende <i>E. coli</i>
Stx (<i>stx</i>)	Shigatoxin (kursiv: Genbezeichnung)
T	Thymin
Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelztemperatur
tRNS	transfer-Ribonukleinsäure
TW	Trinkwasser
UV	Ultraviolett
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxinbildende <i>Escherichia coli</i>
WA	Wasser
Y-1-Zellen	adrenale Mauszelllinie
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Abbildungsverzeichnis

Bild 1	Theodor Escherich aus www.wikipedia.de aufgerufen am 29.06.2008
Grafik 2	Shigatoxin schematisch
Grafik 3	Modell der Toxinaufnahme und des Toxintransports
Grafik 4	Karte eines integrierten Bakteriophagen
Grafik 5	Erzeugung der Fluoreszenzsignale mit Hybridisierungssonden
Grafik 6	Vorgehensweise in der vorliegenden Studie
Grafik 7	Lage der Primer und Sonden für Shigatoxingruppe 1
Grafik 8	Hybridisierungsbereiche der Sonden STEC-I HP1 und STEC-I HP2 für Shigatoxingruppe 1 (<i>stx1</i> , <i>stx1c</i> , <i>stx1d</i>)
Grafik 9	Lage der Primer und Sonden für Shigatoxingruppe 2
Grafik 10	Hybridisierungsbereiche der Sonden STEC-II HP1 und STEC-II HP2 in Shigatoxingruppe 2 (<i>stx2</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d</i> , <i>stx2e</i>)
Grafik 11	Verteilung der beiden Toxingruppen in den Untersuchungsmatrizes
Grafik 12	Feintypisierung der STEC-Isolate: Shigatoxingruppe 1 (<i>stx1</i> , <i>stx1c</i> , <i>stx1d</i>)
Grafik 13	Feintypisierung der STEC-Isolate: Shigatoxingruppe 2 (<i>stx2</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d</i> , <i>stx2e</i>)
Grafik 14	Schmelzkurven der Referenzstämme und eines in der Schmelztemperatur von den Referenzstämmen abweichenden STEC-Isolats
Grafik 15	Hybridisierungsbereich der Sonden für <i>stx2/2c</i> und die Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus der Schmelztemperaturgruppe 65,9°C
Grafik 16	Hybridisierungsbereich der Sonden für <i>stx2e</i> und die Gensequenz des STEC-Isolats 2315 aus der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C
Grafik 17	Bindung der Primer GK3/4 am Referenzstamm <i>stx2g</i>
Grafik 18	Sequenzvergleich <i>stx2g</i> und <i>stx2e</i> im Hybridisierungsbereich der Sonden STEC-II HP1/2
Grafik 19	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2</i> : 3 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (99,6 % Sequenzhomologie)

Grafik 20	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2c</i> : 4 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (99,4 % Sequenzhomologie)
Grafik 21	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2d</i> : 29 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (95,7 % Sequenzhomologie)
Grafik 22	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 4139 aus Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2e</i> : 43 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 680 bp (93,7 % Sequenzhomologie)
Grafik 23	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2</i> : 42 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (93,8 % Sequenzhomologie).
Grafik 24	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2c</i> : 40 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (94,1 % Sequenzhomologie).
Grafik 25	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2d</i> : 42 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (93,8 % Sequenzhomologie).
Grafik 26	Vergleich der Gensequenz des STEC-Isolats 2315 der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C mit der Gensequenz des Referenzstamms <i>stx2e</i> : 2 Sequenzunterschiede auf einer Länge von 682 bp (99,7 % Sequenzhomologie).
Grafik 27	Gensequenzen der Schmelztemperaturgruppe 65,9 °C der Isolate mit DNA-Sequenz-Übereinstimmung zur Variante ECB-217 von De Baets et al. (2003) Accession-Nr. AY443054
Grafik 28	Gensequenzen der Schmelztemperaturgruppe 63,3 °C der Isolate mit DNA-Sequenz-Übereinstimmung zur Variante 3615-99 von Reischl et al. (2002) Accession-Nr.: AJ313016

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	<i>E- coli</i> -Shigatoxintypen mit Referenzstämmen
Tabelle 2	STEC-Nachweis bei Lebensmittelplanproben
Tabelle 3	Untersuchte Isolate
Tabelle 4	Kontrollstämmen
Tabelle 5	Mastermix für die Real-Time-PCR
Tabelle 6	Protokoll der Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 7	Hybridisierungssonden
Tabelle 8	Mastermix für PCR mit Primerpaar LP43/44
Tabelle 9	Mastermix für PCR mit Primerpaar BIF/BIR
Tabelle 10	Mastermix für PCR mit Primerpaar FK1/2
Tabelle 11	Mastermix für PCR mit Primerpaar GK3/4
Tabelle 12	Mastermix für PCR mit Primerpaar VT2cm/VT2f
Tabelle 13	Mastermix für PCR mit Primerpaar KS7/8
Tabelle 14	Mastermix für PCR mit Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR
Tabelle 15	Mastermix für PCR mit Primerpaar stx1c-1/2
Tabelle 16	Mastermix für PCR mit Primerpaar Lin-up /1 _{OX3}
Tabelle 17	Ansatz für Sequenzierreaktion
Tabelle 18	Protokoll Sequenzierreaktionen
Tabelle 19	Verwendete Primer
Tabelle 20	PCR-Protokolle
Tabelle 21	Schmelztemperaturen der Referenzgene mit Anzahl der Fehlpaarungen im Hybridisierungsbereich der Sonden
Tabelle 22	Durch Schmelzkurvenanalyse ermittelte Häufigkeit der Shigatoxintypen und deren Kombinationen
Tabelle 23	Verteilung der Shigatoxintypen ermittelt mit Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 24	Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Lebensmitteln ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 25	Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Fäzes ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 26	Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Wasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse

Tabelle 27	Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Oberflächenwasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 28	Verteilung der Shigatoxintypen in Isolaten aus Trinkwasser ermittelt durch Schmelzkurvenanalyse
Tabelle 29	Temperaturdifferenzen der abweichenden Isolate zu den Referenzstämmen
Tabelle 30	Sequenzierte Isolate
Tabelle 31	Isolate mit Herkunft und per Schmelzkurvenanalyse detektierten Shigatoxintypen

12. Literaturverzeichnis

A

Acheson, DWK.; Keusch, GT. (1999)

The family of Shiga toxins.

In: Alouf, SE.; Freer, JH. (Eds):

The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxin.

Academics Press, London

Ackman, D.; Marks, S.; Mack, P.; Caldwell, M.; Root, T.; Birkhead, G. (1997)

Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake.

Epidemiol Infect 119: 1–8

Ahmad, A.; Nagaraja, TG.; Zurek, L. (2007)

Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies.

Prev Vet Med 80: 74–81

Aoshima, T.; Sekido, Y.; Miyazaki, T.; Kajita, M.; Mimura, S.; Watanabe, K.; Shimokata, K.; Niwa, T. (2000)

Rapid Detection of Deletion Mutations in Inherited Metabolic Diseases by Melting Curve Analysis with LightCycler.

Clin Chem 46: 119–122

Arab, S.; Lingwood, CA. (1998)

Intracellular Targeting of the Endoplasmatic Reticulum/Nuclear Envelope by Retrograde Transport May Determine Cell Hypersensitivity to Verotoxin Via Globotriaosyl Ceramide Fatty Acid Isoform Traffic.

J Cell Physiol 177: 646–660

B

Barman, NN.; Deb, R.; Ramamurthy, T.; Sharma, RK.; Borah, P.; Wani, SA.; Kalita, D. (2008)

Molecular characterization of shiga like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from pigs oedema.

Indian J Med Res 127: 602–606

Bauerfeind, R.; Barth, S.; Tscholchiew, A.; Vallejo, G.; Weiss, R. (2004)

Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland.

EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 22.–24.07.2004 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/doc/ehec_workshop_tagungsband2004.pdf

zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

- Baylis, CL.; MacPhee, S.; Robinson, AJ.; Griffiths, R.; Lilley, K.; Betts, RP. (2004)
Survival of *Escherichia coli* O157:H7, O111:H- and O26:H11 in artificially contaminated chocolate and confectionery products.
Int J Food Microbiol 96: 35–48
- Besser, RE.; Lett, SM.; Weber, JT.; Doyle, MP.; Barrett, TJ.; Wells, JG.; Griffin, PM. (1993)
An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider.
JAMA 269: 2217–2220
- Beutin, L.; Geier, D.; Steinbrück, H.; Zimmermann, S.; Scheutz, F. (1993)
Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals.
J Clin Microbiol 31: 2483–2488
- Bielaszewska, M.; Köck, R.; Friedrich, AW.; Eiff, C.; Zimmerhackl, LB.; Karch, H.; Mellmann, A. (2007)
Shiga Toxin-Mediated Hemolytic Uremic Syndrome: Time to Change the Diagnostic Paradigm?
PLoS ONE 2(10): e1024. doi:10.1372/journal.pone.0001024
- Bielaszewska, M.; Friedrich, AW.; Aldick, T.; Schürk-Bulgrin, R.; Karch, H. (2006)
Shiga Toxin Activatable by Intestinal Mucus in *Escherichia coli* Isolated from Humans: Predictor for a Severe Clinical Outcome.
Clin Infect Dis 43: 1160–1167
- Blanco, M.; Blanco, JE.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, JM.; Hermoso, M.; Hermoso, J.; Alonso, MP.; Dahbi, G.; Gonzalez, EA.; Bernardez, MI.; Blanco, J. (2003)
Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain.
J Clin Microbiol 41: 1351–1356
- Blanco, J.; Gonzalez, EA.; Espinosa, P.; Blanco, M.; Garabal JJ.; Alonso MP. (1992)
Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhoea in Spain.
Eur J Epidemiol 8: 548–552
- Bockemühl, J.; Karch, H. (1996)
Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994–1995).
Bundesgesundhbl 39: 290–296
- Boerlin, P.; McEwen, SA.; Boerlin-Petzold, F.; Wilson, JB.; Johnson, RP.; Gyles, CL. (1999)
Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans.
J Clin Microbiol 37: 497–503

Borell, JA. (2005)

Molekulare Feintypisierung von Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* als Grundlage einer Risikobewertung.

Diss. med., Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Bräunig (2001)

Lebensmittelrechtliche Beurteilung von verotoxinogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (VTEC/EHEC).

54. Arbeitstagung des ALTS in Berlin 19.–21.06.2001

Brett, KN.; Ramachandran, V.; Hornitzky, MA.; Bettelheim, KA.; Walker, MJ.; Djordjevic, SP. (2003)

*stx*_{1c} Is the Most Common Shiga Toxin 1 Subtype among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Sheep but Not among Isolates from Cattle.

J Clin Microbiol 41: 926–936

Brown, TA. (2002)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR).

In: Gentechnologie für Einsteiger.

Spektrum Verlag, Heidelberg Berlin

Bülte, M.; Goll, M. (2006)

Pathogene Mikroorganismen - *Escherichia coli* und Shigellen.

Georg-Thieme-Verlag, 1. Auflage, Hamburg

Bülte, M. (2002)

Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E.-coli*-Stämme (EHEC).

Bundesgesundhbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 45: 484–490

Bülte, M. (2001)

Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten.

Berl Munch Tierarztl Wschr 114: 473–477

Bülte, M. (2000)

Versuch einer lebensmittelrechtlichen Bewertung von Verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC).

53. Arbeitstagung des ALTS in Berlin vom 14.–15. 06.2000

Bülte, M. (1997)

Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC): Gefährdung des Verbrauchers.

Munch Med Wochenschr 139: 109

Burckhardt, F.; Heißenhuber, A.; Morlock, G.; Busch, U.; Schindler, P.; Fruth, A.; Ammon, A.; Wildner, M. (2005)

Risikofaktoren der Belastung durch Shigatoxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) in Kläranlagen.

Gesundheitswesen 67: 858–861

- Busch, U.; Hörmansdorfer, S.; Schraner, S.; Huber, I.; Bogner, K.; Sing, A. (2007a)
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Excretion by Child and Her Cat.
Emerg Infect Dis 13: 348–349
- Busch, U. (2007b)
Real-Time PCR.
J Verbr Lebensm 2: 111–112
- Busch, U.; Huber, I.; Messelhäuber, U.; Hörmannsdorfer, S.; Sing, A. (2007c)
Nachweis Shigatoxin-bildender / Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC / EHEC)
mittels Real-Time PCR.
J Verbr Lebensm 2: 144–148
- Busch, U.; Huber, I.; Hörmannsdorfer, S.; Beck, H.; Weiß, HP.; Rinder, H.; Höller, C. (2005)
Amtliche Lebensmittelüberwachung: Von der Planprobe bis zum EU-Schnellwarnsystem.
Nachweis von STEC in verzehrfertigen Produkten.
46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen 27.–30.09.2005
- Bürk, C.; Mayrshofer, X.; Märklbauer, E. (2007)
Pathogenitätsfaktoren bei Shigatoxin 1-Varianten -bildenden *E. coli* aus Rind und Schaf.
48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen 26.–28.09.2007
- Bürk, C.; Dietrich, R.; Acar, G.; Moravek, M.; Bülte, M.; Märklbauer, E. (2003)
Identification and Characterization of a New Variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of Bovine Origin.
J Clin Microbiol 41: 2106–2112

C

- Campbell, A. (1997)
Biologie.
Markl, J. (Hrsg.) Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage, Heidelberg
- Campbell, A. (1994)
Comparative molecular biology of lambdoid phages.
Annu Rev Microbiol 48: 193–222
- Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugere, H.; Oswald, E. (2005)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission.
Vet Res 36: 289–311
- Cardullo, RA.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, PC.; Wolf, DE. (1988)
Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 8790–8794

Cebula, TA.; Payne, WL.; Feng, P. (1995)

Simultaneous Identification of Strains of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 and Their Shiga-like Toxin Type by Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR.
J Clin Microbiol 33: 248–250

Chiueh, L.; Liu, F.; Shih, DY. (2002)

Prevalence of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in feed and raw milk of domestic cattle and sheep.
J Food Drug Anal 10: 39–46

Conraths, FJ.; Geue, L.; Groschup, MH.; Hänel, I.; Henning, K.; Köhler, H.; Melzer, F.; Methner, U.; Moser, I.; Müller, T. Raßbach, A.; Sachse, K.; Schares, G.; Schulz, F.; Tackmann, K.; Werner, O.; Mettenleiter, TC. (2004)

Zoonosen der Nutz- und Wildtiere und ihre Bedeutung in Deutschland.
Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 47: 633–646

Crump, JA.; Sulka, AC.; Langer, AJ.; Schaben, C.; Crielly, AS.; Gage, R.; Baysinger, M.; Moll, M.; Withers, G.; Toney, DM.; Hunter, SB.; Hoekstra, M.; Wong, SK.; Griffin, PM.; Van Gilder, TJ. (2002)

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm.
N Engl J Med 347: 555–560

Cullor, JS. (1997)

Risks and prevention of contamination of dairy products.
Rev Sci Tech 16: 472–481

D

Datz, M.; Janetzki-Mittmann, C.; Franke, S.; Gunzer, F.; Schmidt, H.; Karch, H. (1996)

Analysis of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA Region Containing Lambdoid Phage Gene p and Shiga-Like Toxin Structural Genes.
Appl Environ Microbiol 62: 791–797

De Baets, L.; Van der Taelen, I.; De Filette, M.; Pierard, D.; Allison, L.; De Greve, H.; Hernalsteens, JP.; Imberechts, H. (2004)

Genetic Typing of Shiga Toxin 2 Variants of *Escherichia coli* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis.
Appl Environ Microbiol 70: 6309–6314

Deschenes, G.; Casenave, C.; Grimont, F.; Desenclos, JC.; Benoit, S.; Collin, M.; Baron, S.; Mariani, P.; Grimont, PA.; Nivet, H. (1996)

Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese.
Pediatr Nephrol 10: 203–205

De Schrijver, K.; Buvens, G.; Possé, B.; Van den Branden, D.; Oosterlynck, O.; De Zutter, L.; Eilers, K.; Piérard, D.; Dierick, K.; Van Damme-Lombaerts, R.; Lauwers, C.; Jacobs, R. (2008)

Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007.
Euro Surveill 13: 7

De Silva, D.; Reiser, A.; Herrmann, M.; Tabiti, K.; Wittwer, C. (1998)
Rapid Genotyping and Quantification on the LightCyclerTM with Hybridization Probes.
Biochemica 2: 12–15

Diepolder, H. (2007)
Beurteilung von Lebensmitteln mit mikrobiell bedingten Kontaminationen i. S. von Art. 14
Abs. 5 VO (EG) Nr. 178/2002.
J Verbr Lebensm Supplement 2: 205–206

Doorduyn, Y.; de Jager, C.; van der Zwaluw, WK.; Friesema, IH.; Heuvelink, AE.; de Boer, E.; Wannet, WJ.; van Duynhoven, YT. (2006)
Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, The Netherlands, September – October 2005.
Euro Surveill 11: 636

Dreesman, J.; Röttgers, HR.; Mellmann, A.; Pulz, M. (2007)
Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie.
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Dundas, S.; Todd, WT.; Stewart, AI.; Murdoch, PS.; Chaudhuri, AK.; Hutchinson, SJ. (2001)
The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients.
Clin Infect Dis 33: 923–931

E

Edrington, TS.; Callaway, TR.; Ives, SE.; Engler, MJ.; Looper, ML.; Anderson, RC.; Nisbet, DJ. (2006)
Seasonal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Ruminants: A New Hypothesis.
Foodborne Pathog Dis 3: 413–421

Effenberger, T.; Fredriksson-Ahomaa, M.; Stolle, A. (2007)
Übertragung von pathogenen Bakterien bei Haustieren durch Rohfleischfütterung.
48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen vom 25.–28.09.2007

Elder, RO.; Keen, JE.; Siragusa, GR.; Barkocy-Gallagher, GA.; Koohmaraie, M.; Laegreid, WW. (2000)
Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing.
Proc Natl Acad Sci 97: 2999–3003

El-Sayed, A.; Ahmed, S.; Awad, W. (2007)
Do camels (*Camelus dromedarius*) play an epidemiological role in the spread of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) infection?
Trop Anim Health Prod 40: 469–473

Erickson, MC. und Doyle, MP. (2007)

Food as a Vehicle for Transmission of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*.
J Food Prot 70: 2426–2449

Escherich, T. (1885)

Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings.
Fortschr Med 3: 514–557

Espie, E.; Grimont, F.; Vaillant, V.; Montet, MP.; Carle, I.; Bavai, C.; De Valk, H.; Vernozy-Rozand, C. (2006)

O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation.
Clin Microbiol Infect 12: 992–998

Ethelberg, S.; Smith, B.; Torpdahl, M.; Lisby, M.; Boel, J.; Jensen, T.; Molbak, K. (2007)

An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007.
Euro Surveill 12: 3208

Ethelberg, S.; Olsen, KEP.; Scheutz, F.; Jensen, C.; Schiellerup, P.; Engberg, J.; Petersen, AM.; Olesen, B.; Gerner-Smidt, P.; Molbak, K. (2004)

Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark.
Emerg Infect Dis 10: 842–847

F

Fallert–Müller, A. (1999/2000)

Lexikon der Biochemie.
Spektrum Verlag Heidelberg Berlin

Finke, C.; Mahler, C.; Stolle, A. (2006)

Rückrufmodell eines VTEC-Falles - zur Problematik der Wiederaufnahme des freien Warenverkehrs.

47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen 26.–29.09.2006

Förster, T. (1948)

Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.
Ann Phys 6: 55–75

Frank, C.; Werber, D. (2007)

Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland - Analyse der Meldedaten 2001 - 2005.

II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9. - 11. Mai 2007 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Franke, S.; Gunzer, F.; Wieler, LH.; Baljer, G.; Karch, H. (1995)

Construction of recombinant Shiga-like toxin-IIv (SLT-IIv) and its use in monitoring the SLT-IIv antibody status in pigs.
Vet Microbiol 43: 41–52

Friedrich, AW.; Borell, J.; Bielaszewska, M.; Fruth, A.; Tschäpe, H.; Karch, H. (2003)
Shiga Toxin 1c-Producing *Escherichia coli* Strains: Phenotypic and Genetic Characterization
and Association with Human Disease.
J Clin Microbiol 41: 2448–2453

Friedrich, AW. (2002a)
Variabilität der Shiga Toxine in *Escherichia coli*.
Hyg Mikrobiol 6: 99–104

Friedrich, AW.; Bielaszewska, M.; Zhang, WL.; Pulz, M.; Kuczius, T.; Ammon, A.; Karch, H. (2002b)
Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with
clinical symptoms.
J Infect Dis 185: 74–84

Friedrich, AW.; Bielaszewska, M.; Karch, H. (2002c)
Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections.
J Lab Med 26: 183–190

Friesema, IH.; Schimmer, B.; Stenvers, O.; Heuvelink, AE.; de Boer, E.; van der Zwaluw, WK.; de Jager, CM.; Notermans, DW.; van Ouwerkerk, I.; de Jonge, R.; von Pelt, W. (2007)
STEC O157 outbreak in the Netherlands, September–October 2007.
Euro Surveill 12: 3297

Fröhlich, J.; Baljer, G.; Menge, C. (2007)
Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC-Ausscheidung
bei Kälbern.
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Fruth, A.; Richter, H.; Timm, M.; Streckel, W.; Klie, H.; Prager, R.; Reissbrodt, R.; Gallien, P.; Skiebe, E.; Rienäcker, I.; Karch, H.; Bockemühl, J.; Perlberg, KW.; Tschäpe, H. (2000)
Zur Verbesserung der gegenwärtigen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli*
(EHEC) - Stufenplan für klinische und epidemiologische Zwecke.
Bundesgesundhbl 43: 310–317

G

Gallien; Stahl; Bülte (2001)
Molekularbiologische Methodenkaskade zur Detektion, Isolierung und Charakterisierung von
STEC-Ergebnissen eines bundesweiten Ringversuches.
54. Arbeitstagung des ALTS in Berlin 19.–21.06.2001

Gallien, P.; Klie, H.; Lehmann, S.; Protz, D.; Helmuth, R.; Schäfer, R.; Ehrler, M. (1994)
Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen
Nutztieren in Sachsen-Anhalt.
Berl Munch Tierarztl Wschr 107: 331–334

- Gannon, VP.; Teerling, C.; Masri, SA.; Gyles, CL. (1990)
Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family.
J Gen Microbiol 136: 1125–1135
- Garcia, A.; Marini, RP.; Feng, Y.; Vitsky, A.; Knox, KA.; Taylor, NS.; Schauer, DB.; Fox, JG. (2002)
A Naturally Occuring Rabbit Model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Induced Disease.
J Infect Dis 186: 1682–1686
- Gareis, M.; Pichner, R.; Brey, N.; Steinrück, H. (2000)
Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* (VTEC) bei gesunden Mitarbeitern eines Fleisch verarbeitenden Betriebes.
Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 43: 781–787
- Garg AX.; Suri, RS.; Barrowman, N.; Rehmann, F.; Matsell, D.; Rosas-Arellano, MP.; Salvadori, M.; Haynes, RB.; Clark, WF. (2003)
Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression.
JAMA 290: 1360–1370
- Gingeras, TR.; Higuchi, R.; Kricka, LJ.; Dennis Lo, YM.; Wittwer, CT. (2005)
Fifty Years of Molecular (DNA/RNA) Diagnostics.
Clin Chem 51: 1–11
- Goll, M. (2005)
Nachweis und DNA-Fingerprinting von *Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden.
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen
- Gourmelon, M.; Montet, MP.; Lozach, S.; Le Mennec, C.; Pommepuy, M.; Beutin, L.; Vernozy-Rozand, C. (2006)
First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France.
J Appl Microbiol 100: 85–97
- Grant, J.; Wendelboe, AM.; Wendel, A.; Jepson, B.; Torres, P.; Smelser, C.; Rolfs, RT. (2008)
Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak, Utah and New Mexico, 2006.
Emerg Infect Dis 14: 1633–1636
- Griffin, PM.; Tauxe, RV. (1991)
The Epidemiology of infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome.
Epidemiol Rev 13: 60–98

H

- Hadorn, HB. (1997)
Theodor Escherich (1857–1911)
In: Darmflora in Symbiose und Pathogenität.
Erhältlich bei Alfred Nissle Gesellschaft e. V., Brüningstr. 16, 58089 Hagen

Hartung, M. (2008)

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2006.
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Hartung, M. (2007a)

Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2005 bei Lebensmitteln.
Fleischwirtsch 87: 98–106

Hartung, M. (2007b)

Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2006 bei Lebensmitteln.
Fleischwirtsch 87: 109–117

Hartung, M. (2006)

Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2004 bei Lebensmitteln.
Fleischwirtsch 86: 155–161

Hartung, M. (2005)

Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2003 in Deutschland bei Lebensmitteln.
Fleischwirtsch 85: 116–122

Heißenhuber, A.; Hautmann, W.; Ludwig, M.; Burckhardt, F.; Lutz, E.; Wildner, M. (2007)
Intensivierte Surveillance des hämolytisch-urämischen Syndroms in Bayern - Ergebnisse des
Jahres 2006.

II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9. - 11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Heißenhuber, A.; Morlock, G.; Busch, U.; Kugler, R.; Sigl, C.; Huber, HC.; Werber, D.;
Ammon, A.; Menzler, S.; Merle, R.; Tschäpe, H.; Roggentin, P.; Wildner, M. (2004)
Risikofaktoren für sporadische EHEC-Erkrankungen in Bayern - Ergebnisse einer Fall-
Kontroll-Studie.

EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 22. - 24.07.2004 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/doc/ehec_workshop_tagungsband2004.pdf
zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Wason, R. (1993)

Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions.
Biotechnol 11: 1026–1030

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, PS.; Griffith, R. (1992)

Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.
Biotechnol 10: 413–417

Holme, R. (2003)

Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event.
Water Sci Tech 47: 1–6

Honda, T. (1999)

Factors influencing the development of hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection: From a questionnaire survey to *in vitro* experiment.

Pediatr Int 41: 209–212

Huang, SW.; Chang, CH.; Tai, TF.; Chang, TC. (1997)

Comparison of the β -Glucuronidase Assay and the Conventional Method for Identification of *Escherichia coli* on Eosin-Methylene Blue Agar.

J Food Prot 60: 6–9

Huber, HC.; Kugler, R.; Liebl, B. (1998)

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) - Ergebnisse einer epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997.

Gesundheitswesen 60: 159–165

Hutchison, CA. (2007)

DNA sequencing: bench to bedside and beyond.

Nucleic Acids Res 35: 6227–6237

I

Ihekweazu, C.; Barlow, M.; Roberts, S.; Christensen, H.; Guttridge, B.; Lewis, D.; Paynter, S. (2006)

Outbreak of *E. coli* O157 infektion in the south west of the UK: risks from streams crossing seaside beaches.

Euro Surveill 11: 128–130

Iijima, K.; Kamioka, I.; Nozu, K. (2008)

Management of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children.

Clin Exp Nephrol 12: 16–19

Itoh, Y.; Sugita-Konishi, Y.; Kasuga, F.; Iwaki, M.; Hara-Kudo, Y.; Saito, N.; Noguchi, Y.; Konuma, H.; Kumagai, S. (1998)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Present in Radish Sprouts.

Appl Environ Microbiol 64: 1532–1535

J

Jackson, MP.; Neill, RJ.; O'Brien, AD.; Holmes, RK.; Newland, JW. (1987)

Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages 933J from *Escherichia coli* 933.

FEMS Microbiol Lett 44: 109–114

Johnson, S., Taylor, CM. (2008)

What's new in haemolytic uraemic syndrome?

Eur J Pediatr 167: 965 - 971

K

- Karch, H.; Bockemühl, J.; Huppertz, H. (2000)
Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Dt Arztebl 97: A 2314–2318
- Karch, H.; Schmidt, H.; Janetzki-Mittmann, C.; Scheff, J.; Kröger, M. (1999)
Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genome of related temperate bacteriophages.
Mol Gen Genet 262: 600–607
- Karch, H.; Hupperts, H.; Bockemühl, J.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A.; Lissner, R. (1997)
Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Germany.
J Food Prot 60: 1454–1457
- Karch, H.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A. (1996)
Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Die gelben Hefte 36: 125–135
- Karch, H.; Rüssmann, H.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A.; Heesemann, J. (1995)
Long-Term Shedding and Clonal Turnover of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Diarrheal Diseases.
J Clin Microbiol 33: 1602–1605
- Karch, H.; Meyer, T.; Rüssmann, H.; Heesemann, J. (1992)
Frequent Loss of Shiga-Like Toxin Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* upon Subcultivation.
Infect Immun 60: 3464–3467
- Karmali, MA. (1989)
Infection by Verocytotoxin Producing *E. coli*.
Clin Microbiol Rev 2: 15–38
- Karmali, MA.; Steele, BT.; Petric, M.; Lim, C. (1983)
Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools.
Lancet 19: 619–620
- Keene, WE.; McAnulty, JM.; Hoesly, FC. (1994)
A Swimming-Associated Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*.
N Engl J Med 331: 579–584
- Klie, H.; Timm, M.; Richter, H.; Gallien, P.; Perlberg, KW.; Steinrück, H. (1997)
Nachweis und Vorkommen von Verotoxin- bzw. Shigatoxin- bildenden *Escherichia coli* (VTEC bzw. STEC) in Milch.
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 110: 337–341

- Koch, C.; Hertwig, S.; Lurz, R.; Appel, B.; Beutin, L. (2001)
Isolation of a Lysogenic Bacteriophage Carrying the *stxI_{ox3}* Gene, Which is Closely Associated with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Sheep and Humans.
J Clin Microbiol 39: 3992–3998
- Kokai-Kun, JF.; Melton-Celsa, AR.; O’Brien, AD. (2000)
Elastase in Intestinal Mucus Enhances the Cytotoxicity of Shiga Toxin Type 2d.
J Biol Chem 275: 3713–3721
- Konowalchuk, J.; Speirs, JI.; Stavric, S. (1977)
Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*.
Infect Immun 18: 775–779
- Krause, G.; Zimmermann, S.; Beutin, L. (2005)
Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types.
Vet Microbiol 106: 87–95
- Kubista, M.; Andrade, JM.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strömbom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N. (2006)
The real-time polymerase chain reaction.
Mol Aspects Med 27: 95–125
- Kuczius, T.; Bielaszewska, M.; Friedrich, AW.; Zhang, W.; (2004)
A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*.
Mol Nutr Food Res 48: 515–521
- Kugler, R.; Busch, U.; Bayer, M.; Gerber, L.; Hellein, G.; Barankay, V.; Huber, HC. (1998)
Vergleich von ELISA, Verozelltest, PCR und immunmagnetischer Separation (IMS) in der Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Stuhlproben.
Bundesgesundhbl Sonderheft Oktober 41: 13–17
- L**
- Lacy, DB.; Stevens, RC. (1998)
Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins.
Curr Opin Struct Biol 8: 778–784
- Lang, G.; Moreano Guerro, F.; Bischoff, A.; Westermann, J.; Kocak, H.; Wolf, S.; Meindl, K.; Heißenhuber, A.; Ludwig, S.; Wildner, M.; Busch, U. (2005)
Validierung der Nachweismethoden von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* mittels Real-Time PCR.
Poster GHU/ISEM - Kongress Erlangen 19.–21.10.2005
- Law, D. (2000)
The history and evolution of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*.
World J Microbiol Biotechnol 16: 701–709

- Lehmann, S.; Timm, M.; Steinrück, H.; Gallien, P. (2006)
Nachweis von STEC im Kot von Hochwild und in Wildfleischproben.
Fleischwirtsch 4: 93–96
- Leung, PHM.; Peiris, Ng, WWSM.; JSM.; Robins-Browne, RM.; Bettelheim, KA.; Yam, WC. (2003)
A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol 69: 7549–7553
- Levine, MM. (1987)
Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent.
J Infect Dis 155: 377–389
- Lingwood, CA. (1996)
Role of verotoxin receptors in pathogenesis.
Trends Microbiol 4: 147–153
- Lingwood, CA.; Law, H.; Richardson, S.; Petric, M.; Brunton, JL.; De Grandis, S.; Karmali, M. (1987)
Glycolipid Binding of Purified and Recombinant *Escherichia coli* Produced Verotoxin in Vitro.
J Biol Chem 262: 8834–8839
- Lipsky, RH.; Mazzanti, CM.; Rudolph, JG.; Xu, K.; Vyas, G.; Bozak, D.; Radel, MQ.; Goldman, D. (2001)
DNA Melting Analysis for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms.
Clin Chem 47: 635–644
- Livak, KJ.; Flood, SJA.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. (1995)
Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization.
PCR Methods Appl 4: 357–362
- Louise, CB.; Obrig, TG. (1995)
Specific Interaction of *Escherichia coli* O157:H7-Derived Shiga-like Toxin II with Human Renal Endothelial Cells.
J Infect Dis 172: 1397–1401
- Ludwig, K.; Sarkim, V.; Bitzan, M.; Karmali, MA.; Bobrowski, C.; Ruder, H.; Laufs, R.; Sobottka, I.; Petric, M.; Karch, H.; Müller-Wiefel, DE. (2002)
Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection and Antibodies against Stx2 and Stx1 in Household Contacts of Children with Enteropathic Hemolytic-Uremic Syndrome.
J Clin Microbiol 40: 1773–1782

M

Maki, DG. (2006)

Don't Eat the Spinach - Controlling Foodborne Infectious Disease.

N Engl J Med 355: 1952–1955

Mattick, K.; Durham, K.; Dominigue, G.; Jorgensen, F.; Sen, M.; Schaffner, DW.; Humphrey, T. (2003)

The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food.

Int J Food Microbiol 85: 213–226

Mayrshofer, FX. (2005)

Zum Vorkommen von Shiga Toxin 1-Varianten beim Rind in Südbayern.

Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

Mayrshofer, X.; Bürk, C.; Busch, U.; Märklbauer, E. (2004)

Nachweis und Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Varianten beim Rind.

Vortrag - 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen 28.09.–01.10.2004

Maule, A. (2000)

Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces.

Symp Ser Soc Appl Microbiol 29: 71S–78S

McEvoy, JM.; Doherty, AM.; Sheridan, JJ.; Thomson-Carter, FM.; Garvey, P.; McGuire, L.; Blair, IS.; McDowell, DA. (2003)

The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir.

J Appl Microbiol 95: 256–266

Meckelein, M.; Frey, A. (2003)

Sequenzierung von DNA

In: Gentechnische Methoden.

Spektrum Verlag, 3. Auflage, Heidelberg Berlin

Mellmann, A., Bielaszewska, M., Borell, J.; Böhler, O.; Karch, H.; Friedrich, AW. (2004)

Prävalenz und Strukturanalyse von Shiga Toxin 1- und 2-Varianten bei enterohämorrhagischen *Escherichia coli*.

1. EHEC Workshop, Wildbad Kreuth 22.–24.07.2004 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/doc/ehec_workshop_tagungsband2004.pdf
zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

Melton-Celsa, AR.; Darnell, SC.; O'Brien AD. (1996)

Activation of Shiga-like Toxins by Mouse and Human Intestinal Mucus Correlates with Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 Isolates in Orally Infected, Streptomycin-Treated Mice.

Infect Immun 64: 1569–1576

- Messelhäußer, U.; Schreiner, H.; Schulze, G.; Sing, A.; Busch, U. (2007)
Nachweis von STEC/EHEC in Fleisch und Fleischerzeugnissen sowie in Umgebungsproben.
Fleischwirtsch 87: 115–118
- Messelhäußer, U. (2005)
Nachweis von Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* und thermophilen *Campylobacter* species bei Almkühen und in auf Almen produzierten Lebensmitteln.
Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München
- Michino, H.; Araki, K.; Minami, S.; Takaya, S.; Sakai, N.; Miyazaki, M.; Ono, A.; Yanagawa, H. (1999)
Massive Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Schoolchildren in Sakai City, Japan, Associated with Consumption of White Radish Sprouts.
Am J Epidemiol 150: 787–796
- Morabito, S.; Dell’Omo, G.; Agrimi, U.; Schmidt, H.; Karch, H.; Cheasty, T.; Caprioli, A. (2001)
Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons.
Vet Microbiol 82: 275–283
- Morlock, G.; Heißenhuber, A.; Sigl, C.; Kugler, R.; Schindler, P.; Busch, U.; Ammon, A.; Wildner, M. (2004)
Nachweis von Shigatoxin bildenden *E. coli* (STEC) in Trink-, Oberflächengewässer- und Klärwasserproben in Südbayern.
EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 22.–24.07.2004 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/doc/ehec_workshop_tagungsband2004.pdf
zuletzt aufgerufen am 30.06.2008
- Moore, JE.; McCalmont, M.; Xu, J.; Nation, G.; Tinson, AH.; Crothers, L.; Harron, DWG. (2002)
Prevalence of Faecal Pathogens in Calves of Racing Camels (*Camelus dromedarius*) in the United Arab Emirates.
Trop Anim Health Prod 34: 283–287
- Müffling, von T.; Smaijlovic, M.; Nowak, B.; Sammet, K.; Bülte, M.; Klein, G. (2007)
Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products.
Int J Food Microbiol 117: 185–191
- Mühlhardt, C. (2003)
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR); DNA - Analyse.
In: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics
Spektrum Verlag, 4. Auflage, Heidelberg Berlin
- Murinda, SE.; Nguyen, LT.; Landers, TL.; Draughon, FA.; Mathew, AG.; Hogan, JS.; Smith, KL.; Hancock, DD.; Oliver, SP. (2004)
Comparison of *Escherichia coli* Isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers.
Foodborne Pathog Dis 1: 178–184

N

Nakao, H.; Takeda, T. (2000)
Escherichia coli Shiga Toxin.
J Nat Toxins 9: 299–313

Nataro, JP.; Kaper, JB. (1998)
Diarrheagenic *Escherichia coli*.
Clin Microbiol Rev 11: 142–201

Naylor, SW.; Gally, DL.; Low, JC. (2005)
Enterohemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine.
Int J Med Microbiol 295: 419–441

Neely, MN.; Friedmann, DI. (1998)
Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release.
Mol Microbiol 28: 1255–1267

Nitzsche, S.; Bielaszewska, M.; Karch, H.; Zweifel, C.; Stephan, R. (2007)
Shiga toxin Stx2d_{activatable} in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter.
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

N.N. (2008a)
Robert Koch-Institut (RKI)
Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Epidemiol Bull 2: 11–15

N.N. (2008b)
<http://www.lerncenter.roche.de/index.htm> zuletzt aufgerufen am 03.05.2008

N.N. (2007a)
Foodborne and Diarrheal Diseases Branch: Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections,
November - December 2006
<http://www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm> zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

N.N. (2007b)
Robert Koch-Institut (RKI)
Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern - Ausgabe 2007 - gemäß §4 Abs. 2 des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG).
http://www.rki.de/cln_091/nn_200532/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/IfSG/Falldefinition,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Falldefinition.pdf zuletzt aufgerufen am 15.08.2008

N.N. (2006a)

<http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm> zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

N.N. (2006b)

<http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606.htm> zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

N.N. (2006c)

Robert Koch-Institut (RKI)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Infektionskrankheiten für 2005.

Robert Koch Institut, Berlin

N.N. (2004)

Robert Koch-Institut (RKI)

Risikofaktoren für sporadische STEC (EHEC)-Erkrankungen.

Epidemiol Bull 50: 433–439

N.N. (2000a)

Robert Koch-Institut (RKI)

Enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Infektionen (EHEC).

Epidemiol Bull 34: 271–275

N.N. (2000b)

Beschlussvorlage zur Beschlussfassung von Änderungen des Einheitlichen Bewertungsmaßstabes (EBM) durch den Bewertungsausschuß nach § 87 Absatz 3 SGB V in der 62. Sitzung am 16. Februar 2000.

Dtsch Arztebl 97: 559–563

O

Oberparleiter, F.; Busch, U.; Sing, A. (2007)

Langzeitausscheider von EHEC - Probleme und Konsequenzen.

II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehc_workshop.htm

zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

O'Brien, AD.; Karmali, MA.; Scotland, SM. (1994)

A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* cytotoxins.

In: Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections.

Karmali, MA.; Goglia, AG. (Hrsg) Elsevier Verlag, Amsterdam

O'Brien, AD.; Lively, TA.; Chen, ME.; Rothmann, SW.; Formal, SB. (1983a)

Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin.

Lancet 1: 702

O'Brien, AD.; La Veck, GD. (1983b)

Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*.

Infect Immun 40: 675–683

- O'Brien, AD.; LaVeck, GD.; Thompson, MR.; Formal, SB. (1982)
Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*.
J Infect Dis 146: 763–769
- O'Brien, AD.; Thompson, MR.; Cantey, JR.; Formal, SB. (1977)
Production of a *Shigella dysenteriae*-like Toxin by Pathogenic *Escherichia coli*.
Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol B-103: 32
- Ogden, ID.; MacRae, M.; Strachan, NJC. (2004)
Is prevalence and shedding of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal?
FEMS Microbiol Lett 233: 297–300
- Ohmura-Hoshino, M.; Ho, S.; Kurazono, H.; Igarashi, K.; Yamasaki, S.; Takeda, Y. (2003)
Genetic and Immunological Analysis of a Novel Variant of Shiga Toxin 1 from Bovine
Escherichia coli Strains and Development of Bead-ELISA to Detect the Variant Toxin.
Microbiol Immunol 47: 717–725
- Oliveira, MG.; Brito, JRF.; Carvalho, RR.; Guth, BEC.; Gomes, TAT.; Vieira, MAM.; Kato, MAMF.; Ramos, IL.; Vaz, TMI.; Irino, K. (2007)
Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Identified as an Important Reservoir of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Brazil.
Appl Environ Microbiol 73: 5945–5948
- Olsen, SJ.; Miller, G.; Breuer, T.; Kennedy, M.; Higgins, C.; Walford, J.; McKee, G.; Fox, K.; Bibb, W.; Mead, P. (2002)
A Waterborne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections and Hemolytic Uremic Syndrome: Implications for Rural Water Systems.
Emerg Infect Dis 8: 370–375
- Omisakin, F.; MacRae, M.; Ogden, ID.; Strachan, NJC. (2003)
Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter.
Appl Environ Microbiol 69: 2444–2447
- Orth, D.; Grif, K.; Dierich, MP.; Würzner, R. (2006)
Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir.
Epidemiol Infect 134: 719–723

P

- Pastari, A. (2007)
Entscheidungsbaum Art. 14 Verordnung (EG) Nr. 178/2002 - Verordnung (EG) Nr. 2073/2005.
J Verbr Lebensm 64: 484–485

Paton, JC.; Paton, AW. (1998)

Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections.
Clin Microbiol Rev 11: 450–479

Paton, AW.; Beutin, L.; Paton, JC. (1995)

Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons.
Gene 153: 71–74

Perna, NT.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, JD.; Rose, DJ.; Mayhew, GF.; Evans, PS.; Gregor, J.; Kirkpatrick, HA.; Posfai, G.; Hackett, J.; Klink, S.; Boutin, A.; Shao, Y.; Miller, L.; Grotbeck, EJ.; Davis, NW.; Lim, A.; Dimalanta, ET.; Potamouisis, KD.; Apodaca, J.; Anantharaman, TS.; Lin, J.; Yen, G.; Schwartz, DC.; Welch, RA.; Blattner, FR. (2001)

Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
Nature 409: 529–533

Persson, S.; Olsen, KEP.; Ethelberg, S.; Scheutz, F. (2007)

Subtyping Method for *Escherichia coli* Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations.
J Clin Microbiol 45: 2020–2024

Pierard, D., Muyldermans, G.; Moriau, L.; Stevens, D.; Lauwers, S. (1998)

Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* Isolates.
J Clin Microbiol 36: 3317–3322

Pirro, F.; Wieler, LH.; Failing, K.; Bauerfeind, R.; Baljer, G. (1995)

Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle.
Vet Microbiol 43: 131–141

Plunkett, G.; Rose, DJ.; Durfee, TJ.; Blattner, FR. (1999)

Sequence of Shiga Toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin as a Phage Late-gene Product.
J Bacteriol 191: 1776–1778

Proulx, F.; Seidmann, EG.; Karpman, D. (2001)

Pathogenesis of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome.
Pediatr Res 50: 163–171

Pupo, GM.; Karaolis, DKR.; Lan, R.; Reeves, PR. (1997)

Evolutionary Relationships among Pathogenic and Nonpathogenic *Escherichia coli* Strains Inferred from Multilocus Enzyme Electrophoresis and *mdh* Sequence Studies.
Infect Immun 65: 2685–2692

R

Ramachandran, V.; Hornitzky, MA.; Bettelheim, KA.; Walker, MJ.; Djordjevic, SR. (2001)
The Common Ovine Shiga Toxin 2-Containing *Escherichia coli* Serotypes and Human
Isolates of the Same Serotypes Possess a Stx2d Toxin Type.

J Clin Microbiol 39: 1932–1937

Ramteke, PW.; Tewari, S. (2007)
Serogroups of *Escherichia coli* from Drinking Water.
Environ Monit Assess 130: 215–220

Rangel, JM.; Sparling, PH.; Crowe, C.; Griffen, PM.; Swerdlow, DL. (2005)
Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002.
Emerg Infect Dis 11: 603–609

Reida, P.; Wolff, M.; Pohls, HW.; Kuhlmann, W.; Lehmacher, A.; Aleksic, S.; Karch, H.;
Bockemühl, J. (1994)
An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care
centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination.
Zentralbl Bakteriol 281: 534–543

Reischl, U.; Youssef, MT.; Kilwinski, J.; Lehn, N.; Zhang, WL.; Karch, H.; Strockbine, NA.
(2002)
Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin,
Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.
J Clin Microbiol 40: 2555–2565

Renz, V. (2006)
Lebensmittelrechtliche Beurteilung und zu ergreifende Maßnahmen beim Nachweis von
VTEC in frischem Hackfleisch in Fertigpackungen (mit Erhitzungshinweis).
J Verbr Lebensm 2: 207–208

Renz, V. (2007)
Beurteilung roher Entenbrüste oder Rindersteaks mit potentiell humanpathogenen Erregern.
J Verbr Lebensm 2: 482–483

Riley, LW.; Remis, RS.; Helgeson, SD.; McGee, HB.; Wells, JG.; Davis, BR.; Hebert, RJ.;
Olcott, ES.; Johnson, LM.; Hargrett, NT.; Blake, PA.; Cohen, ML. (1983)
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.
N Engl J Med 306: 681– 685

Rivas, L.; Fegan, N.; Dykes, GA. (2007)
Attachment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to stainless steel.
Int J Food Microbiol 115: 89–94

Roldgaard, BB.; Scheutz, F.; Boel, J.; Aabo, S.; Schultz, AC.; Cheasty, T.; Nielsen, EM.;
Olsen, KEP.; Christensen, BB. (2004)
VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute
a minor part of VTEC O157 isolates from Danish Cattle.
Int J Med Microbiol 294: 255–259

S

Saiki, RK.; Gelfand, DH.; Stoffel, S.; Scharf, SJ.; Higuchi, R.; Horn, GT.; Mullis, KB.; Ehrlich, HA. (1988)
Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase.
Science 239: 487–491

Sancak, AA.; Rutgers, HC.; Hart, CA.; Batt, RM. (2004)
Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea.
Vet Rec 154: 101–106

Sandvig, K.; Van Deurs, B. (2000)
Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives.
EMBO J 19: 5943–5950

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, AR. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463–5467

Sasaki, T.; Kobayashi, M.; Agui, N. (2000)
Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food.
J Med Entomol 37: 945–949

Scheutz, F.; Strockbine, NA. (2005)
Escherichia
In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
Springer Verlag, 2. Auflage

Schierack, P.; Steinrück, H.; Kleta, S.; Vahjen, W. (2006)
Virulence Factor Gene Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Clinically Healthy Pigs.
Appl Environ Microbiol 72: 6680–6686

Schimmer, B.; Nygard, K.; Eriksen, H.; Lassen, J.; Lindstedt, B.; Brandal, LT.; Kapperud, G.; Aavitsland, P. (2008)
Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx*₂-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages.
BMC Infect Dis 8: 41–50

Schindler, PRG.; Elmer-Englhard, D.; Huber, HC. (2003)
Überwachung der Badegewässer in Südbayern unter Berücksichtigung aktueller Krankheitserreger.
Münchn Beitr Abw Fisch u Flussbiol 55: 41–60

Schmidt, H.; Scheef, J.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Wieler, LH.; Karch, H. (2000)
A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons.
Appl Environ Microbiol 66: 1205–1208

- Schmidt, H.; Kernbach, C.; Karch, H. (1996)
Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
Microbiology 142: 907–914
- Schmidt, H.; Karch, H.; Beutin, L. (1994)
The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family.
FEMS Microbiol Lett 117: 189–196
- Schmitt, CK.; McKee, ML.; O'Brien, AD. (1991)
Two Copies of Shiga-Like Toxin II-Related Genes Common in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Are Responsible for the Antigenic Heterogeneity of the O157:H-strain E32511.
Infect Immun 59: 1065–1073
- Schouten, JM.; van de Giessen, AW.; Frankena, K.; De Jong, MCM.; Graat, EAM. (2005)
Escherichia coli O157 prevalence in Dutch poultry, pig finishing and veal herds and risk factors in Dutch veal herds.
Prev Vet Med 70: 1–15
- Schranner, S.; Hörmansdorfer, S.; Bogner, K.; Busch, U.; Sing, A. (2007)
Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC.
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9. - 11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008
- Scotland, SM.; Smith, HR.; Rowe, B. (1985)
Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157.
Lancet 1: 885–886
- Sharma, VK. (2002)
Detection and Quantitation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157; O111, and O26 in Beef and Bovine Feces by Real-Time Polymerase Chain Reaction.
J Food Prot 65: 1371–1380
- Shere, JA.; Bartlett, KJ.; Kaspar, CW. (1998)
Longitudinal Study of *Escherichia coli* O157:H7 Dissemination on Four Dairy Farms in Wisconsin.
Appl Environ Microbiol 64: 1390–1399
- Shiga, K. (1898)
Über den Dysenterie-Bacillus (*Bacillus dysenteriae*).
Zentralbl Bakteriolog Orig 24: 913–918
- Siegler, RL.; Obrig, TG.; Pysher, TJ.; Tesh, VL.; Denkers, ND.; Taylor, FB. (2003)
Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome.
Pediatr Nephrol 18: 92–96

Söderström, A.; Österberg, P.; Lindqvist, A.; Jönsson, B.; Lindberg, A.; Blide Ulander, S.; Welinder-Olsson, C.; Löfdahl, S.; Kaijser, B.; De Jong, B.; Kühlmann-Berenzon, S.; Boqvist, S.; Eriksson, E.; Szanto, E.; Andersson, S.; Allestam, G.; Hedenström, I.; Ledet Muller, L.; Andersson, Y. (2008)

A Large *Escherichia coli* O157 Outbreak in Sweden Associated with Locally Produced Lettuce.

Foodborne Pathog Dis 5: 339–349

Söderström, A.; Lindberg, A.; Andersson, Y. (2005)

EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. Euro Surveill 10: 2794

Solomon, EB.; Yaron, S.; Matthews, KR. (2002)

Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization.

Appl Environ Microbiol 68: 397–400

Sonnenborn, U.; Greinwald, R. (1991)

Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora unter besonderer Berücksichtigung von Physiologie und Funktion der normalen *Escherichia coli* Flora.

Schattauer Verlag, 2. Auflage, Stuttgart

Stark, K.; Frank, C.; Kapfhammer, S.; Werber, D.; Held, L. (2007)

Rinderdichte - Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* in Deutschland.

II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Stephan, R.; Hoelzle, LE. (2000)

Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP.

Lett Appl Microbiol 31: 139–142

Stephan, R.; Kuhn, K. (1999)

Prevalence of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* (VTEC) in Bovine Coli Mastitis and their Antibiotic Resistance Patterns.

J Vet Med B 46: 423–427

Stolle, A. (2005)

Auftreten von STEC in einem Lebensmittelbetrieb - Erarbeiten einheitlicher Kriterien zur Wiederaufnahme des freien Warenverkehrs.

58. Arbeitstagung des ALTS in Berlin 14.–16.06.2005

Strockbine, NA.; Jackson, MP.; Sung, LM.; Holmes, RK.; O'Brien AD. (1988)

Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga Toxin from *Shigella dysenteriae* Type 1.

J Bacteriol 170: 1116–1122

Strockbine, NA.; Marques, LRM.; Newland, JW.; Smith, HW.; Holmes, RK.; O'Brien AD. (1986)

Two Toxin-Converting Phages from *Escherichia coli* O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biologic Activities.

Infect Immun 53: 135–140

T

Tasara, T.; Bielaszewska, M.; Nitzsche, S.; Karch, H.; Zweifel, C.; Stephan, R. (2008) Activatable Shiga toxin 2d (Stx2d) in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter.

Vet Microbiol doi:10.1016/j.vetmic.2008.03.001

Tesh, VL.; Burris, JA.; Owens, JW.; Gordon, VM.; Wadolkowski, EA.; O'Brien, AD.; Samuel, JE. (1993)

Comparison of the Relative Toxicities of Shiga-like Toxins Type I and Type II for Mice.

Infect Immun 61: 3392–3402

Trevena, WB.; Hooper, RA.; Wray, C.; Willshaw, GA.; Chaesty, T.; Domingue, G. (1996)

Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals.

Vet Rec 138: 400

Tschäpe, H.; Fruth, A. (2000)

EHEC.

In: Emerging Bacterial Pathogens.

Karger Verlag, Zürich

V

Varma, JK.; Greene, KD.; Reller, ME.; DeLong, SM.; Trottier, J.; Nowicki, SF.; DiOrio, M.; Koch, EM.; Bannerman, TL.; York, ST.; Lambert-Fair, M.; Wells, JG.; Mead, PS. (2003)

An Outbreak of *Escherichia coli* O157 Infection Following Exposure to a Contaminated Building.

JAMA 290: 2709–2712

Vu-Khac, H.; Cornick, NA. (2008)

Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam.

Vet Microbiol 126: 356–363

W

Wachtel, MR.; McEvoy, JL.; Luo, Y.; Williams-Campbell, AM.; Solomon, MB. (2003)

Cross-contamination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *Escherichia coli* O157:H7 via contaminated ground beef.

J Food Prot 66: 1176–1183

Wagner, PL.; Waldor, MK. (2002)

Bacteriophage Control of Bacterial Virulence.

Infect Immun 70: 3985–3993

Wallace, JS.; Cheasty, T.; Jones, L. (1997)

Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds.
J Appl Microbiol 82: 399–404

Wang, G.; Zhao, T.; Doyle, PM. (1996)

Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine feces.
Appl Environ Microbiol 62: 2567–2570

Warburton, DW.; Austin, JW.; Harrison, BH.; Sanders, G. (1998)

Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water.
J Food Prot 61: 948–952

Watanabe, H.; Wada, A.; Inagaki, Y.; Itoh, K.; Tamura, K. (1996)

Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996
Lancet 348: 831–832

Weinstein, DL.; Jackson, MP.; Samuel, JE.; Holmes, RK.; O'Brien, AD. (1988)

Cloning and Sequencing of a Shiga-Like Toxin Type II Variant from an *Escherichia coli* Strain Responsible for Edema Disease of Swine.
J Bacteriol 170: 4223–4230

Werber, D.; Behnke, SC.; Fruth, A.; Merle, R.; Menzler, S.; Glaser, S.; Kreienbrock, L.;

Prager, R.; Tschäpe, H.; Roggentin, P.; Bockemühl, J.; Ammon, A. (2007a)

Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infection in Germany - Different Risk Factors for Different Age Groups.
Am J Epidemiol 165: 425–434

Werber, D.; Mason, BW.; Meirion, RE.; Salmon, RL. (2007b)

Kohortenstudie zu sekundären Haushaltsübertragungen Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* der Serogruppe O157 - eine Möglichkeit zur Intervention?
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9. - 11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Werber, D.; Behnke, S.; Fruth, A.; Merle, R.; Menzler, S.; Giffei, C.; Glaser, S.; Prager, R.;

Roggentin, P.; Tschäpe, H.; Bockemühl, J.; Ammon, A. (2004)

Risikofaktoren für sporadische STEC-Erkrankungen in Deutschland - Ergebnisse einer bundesweiten Fall-Kontroll-Studie.

EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 22.– 24.07.2004 erhältlich bei:

http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/doc/ehec_workshop_tagungsband2004.pdf
zuletzt aufgerufen am 01.03.2008

Weyland, G.; Stiebing, A. (2007)

Was ist erlaubt, was ist verboten?
Fleischwirtsch 87: 64–66

Wittwer, CT.; Herrmann, MG.; Moss, AA.; Rasmussen, RP. (1997)

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.
Biotechniques 22: 130–138

Wong, CS.; Jelacic, S.; Habeeb, RL.; Watkins, SL.; Tarr, PI. (2000)
The risk of the hemolyticuuremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections.
N Engl J Med 342: 1930–1936

Z

Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Friedrich, AW.; Kuczius, T.; Karch, H. (2005)
Transcriptional Analysis of Genes Encoding Shiga Toxin 2 and Its Variants in *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol 71: 558–561

Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Kuczius, T.; Karch, H. (2002)
Identification, Characterization and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans.
J Clin Microbiol 40: 1441–1446

Zimmerhackl, LB.; Verweyen, H.; Gerber, A.; Karch, H.; Brandis, M. (2002)
Das hämolytisch-urämische Syndrom.
Dtsch Arztebl 99: A 196–203

Zschöck, M.; Hamann, HP.; Kloppert, B.; Wolter, W. (2000)
Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties.
Lett Appl Microbiol 31: 203–208

Zweifel, C.; Schuhmacher, S.; Danuser, J.; Stephan, R. (2007)
Prevalence of STEC in Swiss raw milk cheese collected at retail level.
II. EHEC-Workshop der AGEV in Wildbad Kreuth 9.–11. Mai 2007 erhältlich bei:
http://www.lgl.bayern.de/aktuell/veranstaltungen/archiv_2007/ehec_workshop.htm
zuletzt aufgerufen am 23.08.2008

Rechtstexte

Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006
BGBl I S. 945

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel
ABl L Nr. 338 S. 1 vom 22.12.2005

Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates
ABl L 325 S. 31 vom 12.12.2003

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, L 07.18 1 (2002)
Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik.
Beuth Verlag, Berlin

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.
ABl L 31 S. 1 vom 01.02.2002

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG), in der Fassung der Bekanntmachung vom 20. Juli 2000
BGBl I S. 1045 zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007
BGBl I S. 2904

Verordnung über die Meldepflicht für EHEC-Ausscheider vom 21. März 1996
GVBl L 6 S. 122 vom 21.03.1996

Danksagung

Frau Privatdozentin Dr. Barbara Schalch danke ich für die Übernahme der Betreuung sowie für die stets freundliche und umgehende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ulrich Busch gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu dieser Dissertation und die sehr engagierte Betreuung sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Ganz besonders danke ich auch den Mitarbeitern des EHEC–Labors Jasmin Fräßdorf, Helga Kocak, Katja Meindl und Sabine Wolf für die sehr gute Einarbeitung und die motivierende und stets herzliche und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenso danke ich Clarissa Günster für die Einarbeitung in die Sequenzierung, Dr. Ingrid Huber, Dr. Ute Messelhäuser und Dr. Regina Schuegger für die stete Beratung und kritische Diskussionsbereitschaft.

Victoria Lang danke ich für die Überlassung humanmedizinischer EHEC–Isolate mit abweichenden Schmelzkurven zur weiteren Untersuchung und die vielen schönen gemeinsamen Stunden.

Allen denjenigen danke ich ganz besonders, die sich die Zeit genommen und die Mühe gemacht haben, das Skript dieser Doktorarbeit Korrektur zu lesen.

Ebenso danke ich Herrn Kraft und Herrn Dr. Lachner von der Tierärztlichen Fakultätsbibliothek der Ludwig–Maximilians–Universität sowie Frau Huber und Frau Lange von der Bibliothek des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.

Allen meinen Freunden danke ich und ganz besonders Nadja, Susanne, Susi, Martin, Astrid, Stefan und Katja, dass sie so oft ohne meine Anwesenheit ausgekommen sind.

Meiner Schwester Margit danke ich für die kurzzeitige finanzielle Unterstützung.

Wolfgang, Dir gilt mein größter Dank für das Verständnis und die Begeisterung sowie die tatkräftige Entlastung bei sonstigen Tätigkeiten und finanziellen Verpflichtungen.

VERÖFFENTLICHUNGEN

A. Bischoff, G. Lang, J. Westermann, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, B. Schalch, U. Busch (2005)

Molekularbiologische Subtypisierung der Shiga Toxingene (*stx1*, *stx2*) aus Lebensmittel- und Umgebungsproben.

Kongress der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin/International Society for Ecological Modelling 19–21.10.2005 in Erlangen

A. Bischoff, G. Lang, J. Westermann, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, B. Schalch, U. Busch (2005)

Differenzierung der Shiga Toxin–Gene von Shiga Toxin–bildenden *Escherichia coli* (STEC) aus Lebensmitteln, Oberflächenwasser und Kotproben mittels Schmelzkurvenanalytik.

46. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 27.–30.09.2005 in Garmisch–Partenkirchen

A. Bischoff, J. Westermann, S. Wolf, K. Meindl, R. Schuegger, B. Schalch, U. Busch (2006)

Untersuchung der Verteilung der Shiga Toxin Subtypen von *Escherichia coli* mittels Schmelzkurvenanalyse.

47. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 26.–29.09.2006 in Garmisch–Partenkirchen

G. Lang, F. Moreano Guerra, A. Bischoff, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, A. Heißenhuber, S. Ludwig, M. Wildner, U. Busch (2005)

Validierung der Real–Time–PCR–Nachweismethode von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli*.

Kongress der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin/International Society for Ecological Modelling 19–21.10.2005 in Erlangen

G. Lang, A. Bischoff, J. Westermann, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, A. Heissenhuber, S. Ludwig, M. Wildner, U. Busch (2005)

Subtypisierung der Shigatoxin–Gene *stx1* und *stx2* aus EHEC–Stämmen mittels PCR.

46. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 27.–30.09.2005 in Garmisch–Partenkirchen

G. Lang, F. Moreano Guerra, A. Bischoff, J. Westermann, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, A. Heissenhuber, S. Ludwig, M. Wildner, U. Busch (2005)

Validierung der Nachweismethoden von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* mittels Real-Time-PCR.

46. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 27.–30.09.2005 in Garmisch-Partenkirchen

J. Westermann, A. Bischoff, H. Kocak, S. Wolf, K. Meindl, B. Schalch, U. Busch (2005)

Nachweis unterschiedlicher Pathovaren von *Escherichia coli* (EHEC, ETEC, EPEC) mittels Real-Time-PCR in Umgebungsproben.

Kongress der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin/International Society for Ecological Modelling 19–21.10.2005 in Erlangen

J. Westermann, A. Bischoff, S. Wolf, K. Meindl, B. Schalch, U. Busch (2005)

Screening von Lebensmittelproben auf verschiedene Pathovaren (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC) von *Escherichia coli* mittels Real-Time-PCR.

46. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 27.–30.09.2005 in Garmisch-Partenkirchen

J. Westermann, A. Bischoff, S. Wolf, K. Meindl, B. Schalch, U. Busch (2006)

Screening von Lebensmittelproben auf verschiedene Pathovaren (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC) von *Escherichia coli* mittels Real-Time-PCR.

47. Arbeitstagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 26.–29.09.2006 in Garmisch-Partenkirchen